

**FIOCRUZ**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**



**UFBA**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**TESE DE DOUTORADO**

**AVALIAÇÃO DE INIBIDORES DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NO  
METABOLISMO REDOX PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE  
CUTÂNEA**

**VINICIUS COSTA SOUZA FERREIRA**

**Salvador – Bahia**

**2019**

**UNIVERSIDADE FEDERAL DA BAHIA  
FACULDADE DE MEDICINA  
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
INSTITUTO GONÇALO MONIZ**

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**AVALIAÇÃO DE INIBIDORES DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO  
REDOX PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA**

**VINICIUS COSTA SOUZA FERREIRA**

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Camila Indiani de Oliveira

Tese apresentada ao Curso de Pós-graduação em Patologia Humana, para obtenção do grau de Doutor.

**Salvador – Bahia**

**2019**

Ficha Catalográfica elaborada pela Biblioteca do  
Instituto Gonçalo Moniz / FIOCRUZ - Salvador - Bahia.

F383a Ferreira, Vinicius Costa Souza.  
Avaliação de inibidores de enzimas envolvidas no Metabolismo Redox para o  
tratamento da leishmaniose cutânea. / Vinicius Costa Souza Ferreira. - 2019.  
75 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Camila Indiani de Oliveira, Laboratório de  
Enfermidades Infecciosas Transmitidas por Vetores.

Tese (Doutorado em Patologia) – Faculdade de Medicina, Universidade  
Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2019.

1. Leishmaniose cutânea. 2. *Leishmania Braziliensis*. 3. Metabolismo. 4.  
Enzimas. I. Título.

CDU 616.993.161

Título da Tese: "AVALIAÇÃO DE INIBIDORES DE ENZIMAS ENVOLVIDAS NO METABOLISMO REDOX PARA O TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE CUTÂNEA"

VINICIUS COSTA SOUZA FERREIRA

FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 20 de dezembro de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA



Dr. Herbert Leone de Matos Guedes  
Professor  
UFRJ



Dra. Natália Machado Tavares  
Pesquisadora  
IGM/Fiocruz



Dr. Jaime Ribeiro Filho  
Pesquisador  
IGM/Fiocruz



Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras  
Pesquisadora  
IGM/Fiocruz



Dra. Camila Indiani de Oliveira  
Pesquisadora  
IGM/Fiocruz

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

“O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de financiamento 001”

Fundação Oswaldo Cruz – Instituto Gonçalo Moniz

Instituto Pasteur de Montevideo

## DEDICATÓRIA

À minha família nas pessoas de Dagmar Alexandria, minha mãe, Ednaldo Alexandria, meu pai e Maiara Ferreira, minha irmã. Amo vocês e divido com vocês este trabalho.

## **AGRADECIMENTOS**

À minha família, especialmente a meus pais Dagmar Alexandria e Ednaldo Alexandria e a minha irmã Maiara Ferreira por todo suporte e apoio que uma família pode dar.

Aos amigos e colegas de trabalho que ajudaram e contribuíram nos meus ensaios. Especialmente a Dra. Sayonara Viana por ser companheira na bancada e na vida. A Dra. Juqueline Cristal pela companhia, risos e conselhos.

À minha orientadora Dra. Camila Indiani. Obrigado por educar, por contribuir intelectualmente, por pensar em minha formação e por ser compreensiva e muitas vezes paciente. Você é um exemplo!

Ao Dr. Marcelo Comini pela colaboração, pela confiança e suporte intelectual.

Aos programas de inclusão social que me trouxeram, homem negro da periferia, até aqui. Isso foi tão importante!

Ao programa de Pós-graduação em Patologia, nas pessoas que deram suporte intelectual, administrativo e financeiro. Especialmente a Simone Fortunato por ser sempre muito gentil comigo.

Aos colegas da Escola Municipal Dona Arlete Magalhães com quem pude compartilhar momentos do meu doutorado.

Aos colegas do LEITV/LIB por facilitarem o trabalho dos estudantes e contribuírem para um ambiente cada dia mais saudável, especialmente à Dra. Valéria Borges e a Andrezza de Souza. À equipe da biblioteca pelo suporte dado nas correções da ABNT.

A todos os meus amigos e familiares, que torceram por mim e vêm em mim um exemplo a ser seguido.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para que eu pudesse chegar até aqui. Muito obrigado!

FERREIRA, Vinicius Costa Souza. Avaliação de inibidores de enzimas envolvidas no Metabolismo Redox para o tratamento da leishmaniose cutânea. 2019. 75 f. Tese (Doutorado em Patologia) - Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

## RESUMO

**INTRODUÇÃO:** No Brasil, a leishmaniose cutânea localizada (LCL) é ocasionada principalmente pela *Leishmania braziliensis*. Para o tratamento da LCL, os medicamentos de escolha são os antimoniais pentavalentes ( $Sb^V$ ), Anfotericina B ou Pentamidina, entretanto, o tratamento com esses medicamentos apresenta limitações tais como toxicidade, custo e/ou duração do tratamento, além do crescente registro de casos de resistência. Assim, é urgente o desenvolvimento de novos compostos anti-leishmania. Entre esses novos compostos, estão os inibidores de enzimas envolvidas no metabolismo redox de tripanossomatídeos tais como a tripanotiona sintetase (TryS), qual está presente unicamente em tripanossomatídeos. Estudos prévios mostraram que a inibição da TryS diminui a proliferação de parasitas do gênero *Trypanosoma* e aumenta a sensibilidade dos parasitas ao peróxido de hidrogênio. **OBJETIVO:** Então, o objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial terapêutico de inibidores da TryS na infecção de *L. braziliensis in vitro* e *in vivo*. **MATERIAL E MÉTODOS E RESULTADOS:** Experimentos *in vitro* com Paullones, uma classe de inibidores de proteínas cinases, mostraram a capacidade desses compostos de inibir a atividade de TryS sob a forma recombinante e de diminuir a infecção de macrófagos por *L. braziliensis*. Dos 16 Paullones testados, cinco diminuíram a infecção de maneira significativa. O Paullone KuRK259 foi o composto mais promissor, apresentando  $EC_{50}$  de  $1,19\mu M$  e índice de seletividade de 20 quando testado contra amastigotas intracelulares. O tratamento *in vitro* com KuRK259 induziu alterações ultraestruturais nos amastigotas, mas não elevou a produção de citocinas, NO ou ROS em macrófagos infectados. O efeito *on target* foi avaliado pela quantificação de tióis de baixo peso molecular e por meio de uma linhagem transgênica, a qual expressa uma proteína repórter sensível a mudanças no metabolismo redox. A análise dos níveis de tióis mostrou um acúmulo de glutathiona após o tratamento com KuRK259 e uma menor quantidade de tripanotiona tanto em promastigotas quanto em amastigotas. Além disso, também observamos um meio intracelular oxidativo na linhagem transgênica tratada com KuRK259. Por fim, empregando um modelo pré-clínico de LCL causado por *L. braziliensis*, observamos que o tratamento *in vivo* com KuRK259 inibiu o desenvolvimento da lesão, mas não diminuiu a carga parasitária. O tratamento também inibiu a produção das citocinas TNF, IFN- $\gamma$  e IL-10 na 6ª semana de infecção e aumentou a produção de IFN- $\gamma$  e IL-6 na 10ª semana. **CONCLUSÕES:** Esses resultados indicam que o KuRK259 é capaz de inibir a atividade da TryS e de modular a infecção *in vitro*, bem como interferir no curso da doença *in vivo*, reforçando a TryS como alvo para o desenvolvimento de novos fármacos.



**Palavras-chave:** Leishmaniose cutânea, Tripanotona sintetase, *Leishmania Braziliensis*, Paullones.

FERREIRA, Vinicius Costa Souza. Evaluation of enzyme inhibitors involved in Redox Metabolism for the treatment of cutaneous leishmaniasis. 2019. 75 f. Tese (Doutorado em Patologia) - Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

## ABSTRACT

**INTRODUCTION:** In Brazil Localized Cutaneous Leishmaniasis (LCL) is caused mainly by *Leishmania braziliensis*. Currently, the treatment of LCL is based on pentavalent antimonials, Amphotericin B or Pentamidin all of which have limitations. Thus, the development of new anti-leishmania drugs is needed. Enzymes involved in the redox metabolism of trypanosomatids such as trypanothione synthetase (TryS) are interesting targets for drug development as they are essential for the parasite metabolism, are uniquely present in the parasites or have little similarity with host enzymes. It was reported that TryS inhibition led a less parasite proliferation and more susceptibility to hydrogen peroxide. **AIM:** The aim of this study is to evaluate the therapeutic effect of TryS inhibitors on *L. braziliensis* infection *in vitro* and *in vivo*. **MATERIAL AND METHODS AND RESULTS:** Experiments with a range of Paullones, known as kinase protein inhibitors, inhibited a recombinant TryS and decreased infection by *L. braziliensis* in J774 macrophages. From 16 Paullones we found 5 that decreased infection and KuRK259 was the promising compound, with EC<sub>50</sub> of 1,19 $\mu$ M and selectivity index of 20 towards intracellular parasites. Investigated compound induced ultrastructural changes in amastigotes but were not able to induce cytokine or NO production. On target effect was assessed by low molecular thiols measurement and a transgenic leishmania sensible to changes in redox metabolism. Analysis of thiols content showed accumulation of glutathione and less levels of trypanothione in promastigotes and amastigotes. Furthermore, an oxidative status in transgenic promastigotes treated with KuRK259 was observed. An *in vivo* essay was performed to evaluate the drug therapeutic potential and Infected animals treated with KuRK259 showed reduced year thickness, but not the parasite load. KuRK259 inhibited the production TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-10 cytokines six weeks post infection and increased IFN- $\gamma$  and IL-6 production ten weeks. **CONCLUSIONS:** We believe KuRK259 inhibit TryS and modulate infection *in vitro* and interfere in experimental CL *in vivo*, reinforcing TryS as a drug target for leishmaniasis treatment.

**Keywords:** Cutaneous leishmaniasis, Trypanothione synthetase, *Leishmania braziliensis*, Paullones

## LISTAS DE FIGURAS E TABELAS

<b>Figura 1.</b> Metabolismo da tripanotona.	20
<b>Figura 2.</b> Estrutura básica de um Paullone.	23
<b>Tabela I.</b> Inibição da tripanotona sintetase (TryS) por 3-chlorokenpaullones $N^6$ -substituídos.	35
<b>Tabela II.</b> Efeito biológico dos 3-chlorokenpaullones $N^6$ -substituídos sobre macrófagos infectados com <i>L. braziliensis</i> .	36
<b>Figura 3.</b> Estrutura do KuRK259 .	37
<b>Figura 4.</b> Efeito biológico de KuRK259 em promastigotas de <i>L. braziliensis</i> .	38
<b>Figura 5.</b> $EC_{50}$ do KuRK259 para as formas amastigotas de <i>L. braziliensis</i> .	39
<b>Figura 6.</b> Efeito biológico do KuRK259 em amastigotas de <i>L. braziliensis</i> .	40
<b>Figura 7.</b> $EC_{50}$ do KuRK259 para macrófagos não infectados e índice de seletividade.	41
<b>Figura 8.</b> Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos infectados e tratados com KuRK259.	42
<b>Figura 9.</b> Produção de citocinas por macrófagos infectados com <i>L. braziliensis</i> e tratados com KuRK259.	44
<b>Figura 10.</b> Produção de óxido nítrico por macrófagos infectados por <i>L. braziliensis</i> e tratados com KuRK259.	45
<b>Figura 11.</b> Produção de ROS por macrófagos infectados por <i>L. braziliensis</i> e tratados com KuRK259.	46
<b>Figura 12.</b> Quantificação de tióis em amastigotas tratados com KuRK259.	47
<b>Figura 13.</b> Status oxidativo intracelular de promastigotas de <i>L. infantum</i> tratados com o KuRK259.	48
<b>Figura 14.</b> Desenvolvimento da LC em camundongos infectados e tratados com o RuRK259.	50

**Figura 15.** Produção de citocinas em animais infectados com *L. braziliensis* e tratados com KuRK259.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ATP</b>	Adenosina trifosfato
<b>DNA</b>	Ácido desoxirribonucleico
<b>CL<sub>50</sub></b>	Concentração letal mediana
<b>EC<sub>50</sub></b>	Concentração efetiva mediana
<b>FeSOD</b>	Ferro superóxido dismutase
<b>GSH</b>	Glutathiona
<b>Gspd</b>	Monoglutationilespermidina
<b>GspS</b>	Monoglutationilespermidina sintetase
<b>LCL</b>	Leishmaniose cutânea localizada
<b>LPG</b>	Lipofosfoglicano
<b>RNA</b>	Ácido ribonucleico
<b>RNAi</b>	RNA de interferência
<b>RNS</b>	Espécies reativas de nitrogênio
<b>ROS</b>	Espécies reativas de oxigênio
<b>Sb<sup>v</sup></b>	Antimonial pentavalente
<b>SOD</b>	Superóxido dismutase
<b>Spd</b>	Espermidina
<b>T(SH)<sub>2</sub></b>	Tripanotiona
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral
<b>TR</b>	Tripanotiona redutase
<b>TryS</b>	Tripanotiona sintetase
<b>TS<sub>2</sub></b>	Tripanotiona oxidada
<b>TXN</b>	Triparredoxina

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	14
1.1	LEISHMANIOSES .....	14
1.2	TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES.....	16
1.3	BALANÇO REDOX EM TRIPANOSSOMATÍDEOS.....	19
1.4	PAULLONES.....	22
<b>2.</b>	<b>JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE</b> .....	25
<b>3.</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	26
<b>4.</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	27
4.1	PAULLONES.....	27
4.2	PARASITAS .....	27
4.3	ANIMAIS .....	27
4.4	ENSAIO DE ATIVIDADE DA TRYS .....	27
4.5	CÉLULAS .....	28
4.6	INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS E TRATAMENTO COM PAULLONES.....	28
4.7	CURVA DE CRESCIMENTO DE <i>L. BRAZILIENSIS</i> .....	29
4.8	ENSAIO DE VIABILIDADE .....	29
4.9	DOSAGEM DE CITOCINAS.....	29
4.10	DOSAGEM DE NO .....	30
4.11	DOSAGEM DE ROS .....	30
4.12	MICROSCOPIA ELETRÔNICA.....	30
4.13	DOSAGEM DE TRIPANOTIONA E GLUTATIONA.....	30
4.14	CLONAGEM, TRANSFECCÃO E SELEÇÃO DE <i>L. INFANTUM</i> REDOX-REPORTER ..	31
4.15	ENSAIO IN VIVO .....	32
4.16	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
<b>5.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	34
5.1	EFEITO DE DIFERENTES PAULLONES NA ATIVIDADE DA TRYS DE <i>L. INFANTUM</i> .....	34
5.2	EFEITO BIOLÓGICO DE DIFERENTES PAULLONES CONTRA FORMAS AMASTIGOTAS DE <i>L. BRAZILIENSIS</i> .....	36
5.3	EFEITO BIOLÓGICO DO KURK259 CONTRA FORMAS PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS DE <i>L. BRAZILIENSIS</i> .....	37
5.4	ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS EM AMASTIGOTAS DE <i>L. BRAZILIENSIS</i> TRATADOS COM O KURK259.....	41
5.5	PRODUÇÃO DE CITOCINAS, ÓXIDO NÍTRICO E ROS POR MACRÓFAGOS INFECTADOS TRATADOS COM KURK259. ....	43

5.6	EFEITO <i>ON TARGET</i> DO TRATAMENTO COM KURK259 EM PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS DE <i>L. BRAZILIENSIS</i> .....	46
5.7	TRATAMENTO COM KURK259 EM UM MODELO PRÉ-CLÍNICO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA.....	49
6.	<b>DISCUSSÃO</b> .....	54
7.	<b>CONCLUSÃO</b> .....	62
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	63

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1 LEISHMANIOSES

As leishmanioses constituem um grupo de doenças parasitárias causadas por uma variedade de espécies parasitas do gênero *Leishmania*, estando presentes em todos os continentes. Atualmente, estima-se entre 12 e 15 milhões o número de pessoas infectadas em todo o mundo e outras 350 milhões de pessoas que vivem em áreas de risco, como grande parte da América do Sul e América Central, África, Ásia e Mediterrâneo. A cada ano surgem de 1,5 a 2 milhões de novos casos causando cerca de 70.000 mortes (TORRES-GUERRERO et al., 2017).

A forma e a gravidade da doença dependem da espécie de *Leishmania* e do estado imunológico do hospedeiro (CUNNINGHAM, 2002). Nas Américas, a leishmaniose tegumentar (LT) é causada por muitas espécies do parasita, sendo as principais: *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* (LAINSON e SHAW, 1978). A LT apresenta diversas manifestações clínicas, e uma das formas principais é a leishmaniose cutânea localizada (LCL). No Brasil, essa forma da doença é ocasionada principalmente pelas espécies *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. A LCL pode produzir grande número de úlceras de pele nas partes expostas do corpo, tais como, face, pernas e braços, que evoluem em cicatrizes permanentes. O número de casos novos anuais de LCL está em torno de 1,5 milhões e segundo o Ministério da Saúde do Brasil, a LCL já foi registrada em todos os estados brasileiros, com média anual de 25.763 casos (BRASIL, 2017). A doença surge após um período de incubação variável, de alguns dias a semanas ou meses, começando sempre pela lesão cutânea, sendo a mucosa comprometida secundariamente. Inicialmente surge uma lesão eritemato-papulosa, no ponto da picada do flebótomo, a qual pode evoluir de pequena pápula eritematosa para pápulo-vesiculosa, pápulo-pustulosa e então para lesões úlcero-crostosas. Em geral, observa-se uma ulceração com bordas elevadas e fundo recoberto por exsudato seroso ou seropurulento, que sangra facilmente com trauma (revisado por MARSDEN e NONATA, 1975).

Os parasitos do gênero *Leishmania* apresentam duas formas em seu ciclo de vida: promastigota e amastigota. A forma promastigota extracelular, encontrada no hospedeiro invertebrado, é alongada e possui um longo flagelo na posição anterior. Logo abaixo da membrana plasmática desses parasitos há uma rede de microtúbulos



subpeliculares responsável pela sua forma. No interior da célula há o núcleo, uma única e longa mitocôndria, complexo de Golgi, entre outras organelas. Uma outra característica importante é a presença da bolsa flagelar na região do flagelo, região importante de endocitose e exocitose na leishmania (revisado por SUNTER; GULL, 2017). A forma amastigota intracelular é encontrada no hospedeiro vertebrado, possui forma arredondada e é menor que a forma promastigota, apresentam as mesmas estruturas citoplasmáticas, entretanto o flagelo nesta forma é reduzido (revisado por HOMMEL, 1999).

Os parasitos do gênero *Leishmania* são transmitidos para os hospedeiros vertebrados por fêmeas de flebotomíneos infectados. Durante o repasto sanguíneo, as fêmeas regurgitam as formas promastigotas metacíclicas dos parasitos na derme do hospedeiro, as quais são fagocitadas por células do sistema imune inato, principalmente os macrófagos. No interior dos macrófagos, no fagolisossomo, as formas promastigotas se diferenciam em formas amastigotas onde sobrevivem, se multiplicam e infectam outras células (revisado por RIBEIRO, 1987; RITTIG; BOGDAN, 2000). Embora o fagolisossomo se apresente como um ambiente hostil, o parasito apresenta várias adaptações que permitem sua sobrevivência.

Macrófagos são células fagocíticas profissionais capazes de eliminar patógenos intracelulares produzindo moléculas microbidas tais como espécies reativas de oxigênio (ROS) e espécie reativa de nitrogênio (RNS) (ILES; FORMAN, 2002). Os parasitos são capazes de inibir a produção dessas moléculas através de diversos mecanismos. As formas promastigotas apresentam em sua membrana moléculas de lipofosfoliglicano (LPG), as quais protegem da ação de ROS e RNS. Além disso, o LPG inibe a maturação do endossomo, a montagem da NADPH oxidase 2 na membrana do fagolisossomo e a acidificação deste pela inibição de uma bomba ATPase vesicular. Uma proteína de membrana, a GP63, está envolvida na inibição do estresse oxidativo causado pelo macrófago através da NOX2 e iNOS. Outra estratégia utilizada pelos parasitos é a indução da expressão de proteínas nos macrófagos, como a superóxido dismutase (SOD), envolvidas na eliminação dessas moléculas microbidas (revisado por GUPTA; OGHUMU; SATOSKAR, 2013; ROSSI; FASEL, 2018). O parasito também apresenta mecanismos de defesa endógenos contra essas moléculas. *Leishmania* possui duas isoformas da enzima FeSOD, que desmuta ânions superóxido no interior dos parasitos em oxigênio e peróxido de hidrogênio, atuando assim como um mecanismo antioxidante (SINGH; GARG; ALI, 2016).

## 1.2 TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES

Para o tratamento da LCL causada por *L. braziliensis*, o medicamento de primeira escolha é o antimonial pentavalente ( $Sb^V$ ), com duas apresentações comerciais: antimoniato-N-metil-glucamina/Glucantime® e estibogluconato de sódio/Pentostam®. Segundo o Ministério da Saúde o indivíduo infectado deve ser tratado com 10mg - 20mg  $Sb^V$ /kg/dia por no mínimo 20 dias e no máximo 40. Os  $Sb^V$  são fármacos leishmanicidas, entretanto o seu mecanismo de ação continua pouco entendido. Existem três modelos de explicação para o modo de ação do fármaco: no primeiro modelo o  $Sb^V$  se comportaria como um pró fármaco que seria reduzida no organismo, por meio de tióis, em  $Sb^{III}$ , uma forma mais tóxica, que se ligaria a TR ou a proteínas dedo de zinco, sendo estas envolvidas em diversos processos celulares. Uma vez que esses alvos são importantes para a sobrevivência do parasito, ocorre a morte celular por apoptose. No segundo modelo, o  $Sb^V$  teria atividade leishmanicida se ligando a elementos do parasito como ribonucleosídeos, interferindo no funcionamento das topoisomerases que são importantes para replicação do DNA (CARVALHO et al., 2019). Em um terceiro modelo o  $Sb^V$  agiria modulando a resposta do hospedeiro, induzindo a produção de citocinas como IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e TNF- $\alpha$  (KOCYIGIT et al., 2002), moléculas microbicidas como ânions superóxido em macrófagos e neutrófilos além de aumentar a atividade fagocítica dessas células (MUNIZ-JUNQUEIRA; DE PAULA-COELHO, 2008). Embora o tratamento com os antimoniais seja o de primeira escolha no Brasil, o mesmo está associado a uma alta toxicidade (BRASIL, 2017) e há um crescente registro de casos de resistência à esse medicamento (MARY et al., 2010; ADAUI et al., 2011; MOREIRA; LEPROHON; OUELLETTE, 2011; WALKER et al., 2012; PONTE-SUCRE et al., 2017; RUGANI et al., 2018;).

A anfotericina B é recomendada como fármaco de segunda escolha para o tratamento da LCL em casos em que o paciente não responde ao tratamento com o  $Sb^V$ . A dose recomendada pelo Ministério da Saúde é de 0,7mg a 1,0mg/kg/dia por 30 dias (BRASIL, 2017). A anfotericina B é um polieno extraído da bactéria *Streptomyces nodosus*, comercializada na forma de Desoxicolato de Anfotericina B, Anfotericina B Lipossomal além de outras formulações lipídicas. O fármaco age ligando-se ao ergosterol presente na membrana do parasito, o que leva à formação de microporos, alterando a permeabilidade da membrana e ocasionando morte celular

(BRAJTBURG et al., 1990). Outros mecanismos como o de auto-oxidação e formação de ROS também já foram propostos (LAMY-FREUND; FERREIRA; SCHREIER, 1985). Apesar de sua alta eficiência, a Anfotericina B apresenta efeitos colaterais importantes como nefrotoxicidade, febre alta entre outros, o que requer hospitalização do paciente, tornando o tratamento mais caro. Além disso as formulações menos tóxicas apresentam um custo maior (BRASIL, 2017).

A miltefosina é um fosfolípido com atividade leishmanicida (CROFT et al., 1987). O Ministério da Saúde no Brasil não recomenda esse medicamento para o tratamento da LCL, entretanto a literatura tem reportado o uso em diversos países como alternativa (SINGH; GARG; ALI, 2016). É o único medicamento disponível para o tratamento oral e a dose recomendada é de 1,5mg a 2,5mg/kg/dia durante 28 dias (SALUD, 2013). Seu mecanismo de ação é diverso e envolve a inibição da síntese de fosfatidilcolina, alteração da composição de esteróis e fosfolípidios (CROFT; SEIFERT; DUCHÊNE, 2003; VENTIN; CINCURÁ; MACHADO, 2018). A miltefosina interfere na quantidade de cálcio intracelular e no potencial de membrana das mitocôndrias induzindo morte celular. Além disso, a miltefosina é capaz de modular a célula do hospedeiro, induzindo a expressão da iNOS2 do macrófago, aumentando o stress nitrosativo no interior do vacúolo (DORLO et al., 2012; WADHONE et al., 2009). Diversos trabalhos têm mostrado uma alta taxa de cura para pacientes tratados com miltefosina, entretanto o medicamento também apresenta efeitos colaterais como distúrbios gastrointestinais, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e teratogenicidade (VERWEIJ et al., 1992, 1993). Além disso, há relatos de recidiva e resistência em pacientes tratados com este fármaco (RIJAL et al., 2013; ESPADA et al., 2019).

A pentamidina também é usada como alternativa para o tratamento da leishmaniose em casos de resistência a outros medicamentos (AMATO et al., 1998; BECKER et al., 1999). O fármaco é um derivado de diamidina aromática e seu mecanismo de ação também é diverso, ligando-se ao DNA do cinetoplasto, alterando a síntese de poliaminas no parasito, bem como é capaz de inibir a ação de seus transportadores e o transportador da arginina. A Pentamidina também altera potencial de membrana mitocondrial levando o parasito a apoptose (revisado por SINGH; GARG; ALI, 2016). Para o tratamento da LCL a dose recomendada é de 2mg a 4mg/kg em dias alternados por 3 a 5 semanas (SALUD, 2013), entretanto a droga apresenta efeitos colaterais adversos, tais como queda brusca de pressão, colapso

cardiovascular, diabetes mellitus dependente de insulina entre outros (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; JHA; SINGH; JHA, 1991).

A literatura tem relatado o aumento nos casos de falha terapêutica em indivíduos tratados com  $Sb^V$ , medicamento de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose (revisado por SUNDAR, 2001; PONTE-SUCRE et al., 2017). Em alguns casos a falha terapêutica está relacionada à resistência dos parasitos ao  $Sb^V$ . O distrito de Bihar, no norte da Índia é um exemplo de falha terapêutica associada à resistência. Foi publicado que 50-65% dos pacientes dessa localidade tratados com  $Sb^V$  tiveram falha terapêutica (SUNDAR et al., 2000) e que cepas associadas à falha terapêutica se mostraram mais resistentes ao tratamento com  $Sb^V$  *in vitro*. Acredita-se que as razões relacionadas a isso são o uso excessivo de doses subterapêuticas, descontinuação do tratamento e o uso de medicamentos de baixo padrão bem como outros fatores associados (revisado por PONTE-SUCRE et al., 2017)

Alguns trabalhos já relataram falha terapêutica no tratamento da LCL causada por espécies das Américas (AREVALO et al., 2007; ROMERO et al., 2001; SANTOS et al., 2004). No que diz respeito à LCL causada por *L. braziliensis*, foi demonstrada uma taxa de cura de 50,8% em pacientes tratados com 20mg de  $Sb^V$  por 20 dias em uma área endêmica do Sul da Bahia (MACHADO et al., 2010; ROMERO et al., 2001). Outro trabalho avaliou a resposta ao tratamento do  $Sb^V$  em 103 pacientes com LCL no Peru e observou-se que 30,4% dos pacientes infectados com *L. braziliensis* apresentaram falha terapêutica, a maior entre as espécies estudadas (AREVALO et al., 2007). Não se sabe se a falha terapêutica nesses pacientes está relacionada com resistência dos parasitos ao  $Sb^V$ . Entretanto, tem sido reportada a existência de cepas de *L. braziliensis* resistentes ao  $Sb^V$  associadas a um tipo atípico de LCL, que não apresenta ulceração com bordas elevadas em locais expostos do corpo (GUIMARÃES et al., 2016; RUGANI et al., 2018).

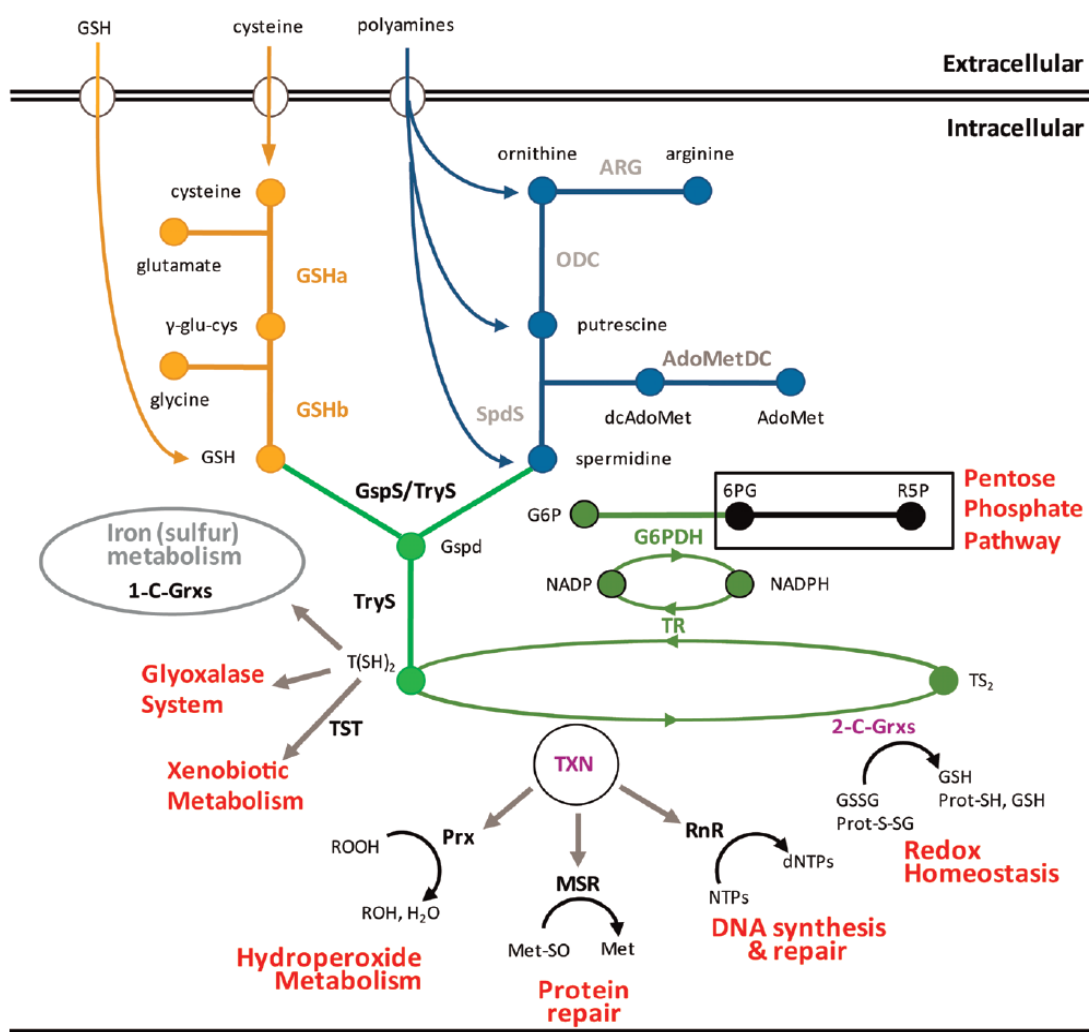
Diversos trabalhos relataram a possibilidade de reaproveitamento de medicamentos (*drug repurposing*), segundo a qual aplicações novas são dadas aos medicamentos já existentes, diminuindo o tempo de aprovação para uso clínico e o custo do desenvolvimento (revisado por CHARLTON et al., 2018). Em um estudo realizado com 164 pacientes apresentando LCL causada por *L. braziliensis*, os indivíduos foram divididos em dois grupos: um grupo recebeu  $Sb^V$  com placebo e o outro recebeu  $Sb^V$  combinado com Pentoxifilina oral, um fármaco capaz de inibir a produção de TNF. Neste ensaio, os autores observaram taxas de cura de 45% para

Sb<sup>v</sup> e 43% para Sb<sup>v</sup> combinado com Pentoxifilina, indicando portanto que a combinação não melhorou as taxas de cura do tratamento monoterápico (BRITO et al., 2017). Um ensaio clínico piloto de fase II com pacientes apresentando LCL também causada por *L. braziliensis* usou o Tamoxifeno, um medicamento utilizado no tratamento do câncer de mama e bipolaridade, em uma formulação oral e tópica combinada com o Sb<sup>v</sup>. Nesse trabalho foi observada uma taxa de cura de 40% para o grupo tratado somente com o Sb<sup>v</sup>, enquanto que os grupos tratados com Sb<sup>v</sup> mais Tamoxifeno tópico ou Sb<sup>v</sup> mais Tamoxifeno oral apresentaram taxas de 36% e 58%, sem diferença significativa entre os tratamentos (MACHADO et al., 2018). Outros trabalhos foram conduzidos na mesma área com o objetivo de encontrar novas formas de tratamento além do Sb<sup>v</sup>, que apresenta baixas taxas de cura nessa localidade (BRITO et al., 2014; MACHADO et al., 2015, 2010). Diante dos resultados negativos obtidos até o momento, continua sendo necessária a descoberta de novas drogas leishmanicidas.

### 1.3 BALANÇO REDOX EM TRIPANOSSOMATÍDEOS

O balanço redox intracelular é necessário para a sobrevivência e proliferação dos organismos vivos. A maioria dos eucariotos e procariotos utiliza a glutatona e a tiorredoxina, complementadas com outras enzimas redutases, para manter a sua capacidade de redução. No entanto, os tripanossomatídeos não possuem glutatona redutase ou tiorredoxina redutase. Ao invés disso, esses organismos desenvolveram um sistema redox único, baseado também em grupos tiol redox-ativos, e esse sistema difere substancialmente daquele classicamente encontrado nos demais eucariotos. Em tripanossomatídeos, o sistema que controla a homeostase redox envolve a tripanotiona [T(SH)<sub>2</sub>], a tripanotiona redutase (TR) e a triparredoxina (TXN), além de outras enzimas (revisado por COMINI; FLOHÉ, 2013) (Figura 1). Os componentes desse sistema, como por exemplo a tripanotiona, estão ausentes em mamíferos ou, se presentes, possuem diferenças estruturais e funcionais marcantes (por exemplo a TR e TXN). Por carecerem de sistemas redox complementares como o da glutatona redutase/glutatona e o da tiorredoxina redutase/tiorredoxina, os tripanossomatídeos dependem exclusivamente de tripanotiona/TR/TXN para manter a homeostase redox intracelular. Outras funções importantes necessárias à sobrevivência também dependem desse sistema. A T(SH)<sub>2</sub> está envolvida no metabolismo de ferro – enxofre,

é capaz de reduzir moléculas como dihidroascorbato, peróxido de hidrogênio e peroxinitrito, eliminar radicais induzidos por radiação, atuar como cofator no sistema da glioxilase de tripanossomatídeos e reagir com xenobióticos eletrofílicos. Além disso, a  $T(SH)_2$  atua no reparo da metionina de proteínas oxidadas, na redução dos precursores difosfato de nucleosídeo em desoxiribonucleotídeos, importantes na replicação e reparo do DNA mitocondrial e na detoxificação de peróxidos de hidrogênio (revisado por KRAUTH-SIEGEL; COMINI, 2008).



**Figura 1. Metabolismo da tripanotona.** (COMINI; FLOHÉ, 2013). O esquema sumariza as diferentes vias metabólicas envolvidas na síntese, redução e utilização de tripanotona ( $T(SH)_2$ ). GspS (monoglutationil-spermidina sintetase), Gspd (monoglutationil-spermidina), TryS (tripanotona sintetase), TR (tripanotona redutase), TXN (triparredoxina). Amarelo, captação e biossíntese de glutatona. Azul, captação e biossíntese de poliaminas. Verde claro, síntese da tripanotona. Verde oliva, redução da tripanotona. Roxo, vias dependentes da tripanotona mediado por redoxinas.

A biossíntese da tripanotona depende de glutatona (GSH) e de espermidina (Spd), as quais são sintetizadas *de novo*, como ocorre em mamíferos, ou são obtidas do meio extracelular. Em um primeiro passo uma molécula GSH é adicionada a uma molécula de Spd, produzindo assim uma monoglutationilespermidina (Gspd). Essa reação pode ser catalisada por uma glutatilonilespermidina sintetase (GspS) ou pela tripanotona sintetase (TryS) dependendo da espécie de tripanossomatídeo. Algumas espécies apresentam somente a TryS, enquanto outras podem apresentar as duas enzimas. O passo final envolve a adição de mais uma molécula de GSH a Gspd produzindo a T(SH)<sub>2</sub>, uma reação catalisada somente pela TryS. A T(SH)<sub>2</sub> participa de diversas reações de troca tiol-dissulfeto e serve como doador de elétrons em diferentes vias metabólicas, como colocado acima. A T(SH)<sub>2</sub> então torna-se oxidada (TS<sub>2</sub>) e necessita ser reconstituída a sua forma reduzida pela TR, uma flavoproteína dependente de NADPH (COMINI; FLOHÉ, 2013). O sistema TS<sub>2</sub>/TR repõe muitas das funções da glutatona/glutatona redutase presente em outros organismos e, portanto, é necessário à sobrevivência do parasita (DUMAS et al., 1997; KRIEGER et al., 2002; TOVAR et al., 1998). Além disso, a T(SH)<sub>2</sub> tem um efeito protetor contra o óxido nítrico (BOCEDI et al., 2010a) e no estresse oxidativo causado por peróxido de hidrogênio (COMINI et al., 2004), ambos metabólitos produzidos por macrófagos durante a infecção por leishmania (LIEW et al., 1990a, 1991).

Diante da importância da T(SH)<sub>2</sub> e de seu papel central no metabolismo redox diversas proteínas envolvidas na sua síntese, consumo e reciclagem tornam-se um alvo potencial para o desenvolvimento de fármacos leishmanicidas (revisado por COLOTTI et al., 2014). Comini e colaboradores (2004) mostraram que a supressão do gene que codifica a TryS de *Trypanosoma brucei* por RNAi levou à depleção da Gspd e da T(SH)<sub>2</sub> e ao acúmulo de glutatona. Na ausência de TryS também houve inibição da proliferação celular, comprometendo a viabilidade dos parasitas e aumento da sensibilidade a peróxido de hidrogênio. Resultados similares foram observados por Ariyanayagam e colaboradores (2005): também por RNAi, os autores reportaram menor proliferação dos parasitas, diminuição da quantidade de tripanotona e Gspd e acúmulo de glutatona. Além disso, os parasitas se mostraram mais sensíveis a medicamentos que afetam o metabolismo da tripanotona como o melarsoprol, triostam, meglumine, nifurtimox e butionina sulfoximina. Em uma abordagem diferente, Wyllie e colaboradores (2009) mostraram que as formas sanguíneas de *T. brucei*

duplo nocaute para TryS apresentaram morte prematura, além de não serem capazes de causar infecção *in vivo*. Torrie e colaboradores (2009), utilizando um ensaio enzimático *in vitro*, identificaram três novos tipos de compostos inibidores da TryS, a partir de ensaios de rastreamento em larga escala. Esses compostos mostraram inibição não competitiva e alostérica da espermidina, do ATP e da glutatona, os substratos da TryS. Além disso, tais compostos foram capazes de inibir o crescimento das formas sanguíneas de *T. brucei* com  $EC_{50}$  variando entre 5 - 30 $\mu$ M. De maneira similar, Spinks e colaboradores (2012) identificaram seis tipos de compostos com atividade inibitória contra a TryS de *T. brucei* que também inibiram a proliferação do parasita. Recentemente, um trabalho mostrou que parasitos de *T. cruzi* geneticamente modificado, capazes de superexpressar TryS apresentam um fenótipo diferente quando comparados a forma selvagem: maior proliferação das formas epimastigotas, maior metaciclogênese das formas tripomastigotas, maior proteção contra stress oxidativo e maior resistência contra medicamentos como nifurtimox e benzinidazol (MESÍAS et al., 2018).

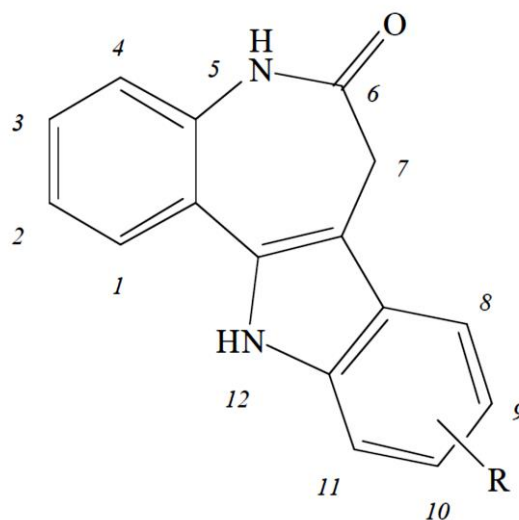
Com relação a *Leishmania*, um trabalho mostrou o efeito de diferentes compostos sobre a atividade de TryS recombinante de *L. donovani* (SAUDAGAR; DUBEY, 2011). Os autores empregaram um ensaio enzimático *in vitro* capaz de quantificar a liberação de fosfato livre e identificaram entre o grupo de compostos, quatro moléculas (a tomatina, conessina, uvaol e betulina) capazes de inibir a TryS. Essas moléculas inibiram a proliferação celular e os níveis de tióis nas formas promastigotas de *L. donovani* sugerindo o potencial terapêutico de moléculas inibidoras da TryS no tratamento das leishmanioses.

#### 1.4 PAULLONES

Paullones (7,12-dihidroindolo[3,2-*d*][1]benzazepina-6(5H)-ones) são inibidores de proteínas cinases, os quais agem principalmente em proteínas cinase dependente de ciclina do tipo 1, 5 e em proteína cinase glicogênio sintase do tipo 3, se ligando ao sítio de ligação do ATP de ambas as proteínas. A síntese dos Paullones foi descrita pela primeira vez em 1992 e desde então tem sido usado em diversos campos como na biologia do desenvolvimento, câncer, doenças cardiovasculares, Alzheimer, diabetes e em algumas doenças parasitárias (revisado por TOLLE; KUNICK, 2011).



Com relação a essas últimas, Stuhlmann e colaboradores (2007) foram os primeiros a reportar que um grupo de moléculas derivadas de Paullones apresentaram atividade inibitória sobre uma TryS recombinante de *Crithidia fasciculata*. Em outro trabalho, moléculas derivadas de Paullones, 2-(3-aryl-3-oxopropeno-1-il)-9-tert-butil-paullones, apresentaram atividade contra *L. donovani*, inibindo o crescimento de amastigotas axênicas e intracelulares, sem causar toxicidade para as células hospedeiras (REICHWALD et al., 2008). 2-arylpaullones inibiram o crescimento de *T. brucei* com EC<sub>50</sub> de 510nM e índice de seletividade de 157 (RYCZAK et al., 2013). Sousa e colaboradores (2014) observaram que um composto derivado de Paullones inibiu a atividade da TryS, também induzindo a morte do parasita. Além disso, foi observado que quanto maior a expressão da TryS, menor foi a capacidade desse composto em induzir a morte da *Leishmania*. Maiwald e colaboradores (2014) mostraram que 4-azapaullones 9 e 11-substituídos são antiparasitários potentes contra formas sanguíneas de *T. brucei*, com EC<sub>50</sub> variando entre 0,12µM e 2,5µM e inibição seletiva contra os parasitos.



**Figura 2.** Estrutura básica de um Paullone

Em um ensaio de rastreamento empregando TryS de *T. brucei*, *T. cruzi* e *L. infantum* sob a forma recombinante e um conjunto de 144 moléculas, observou-se que uma molécula derivada de Paullone, o MOL2008, inibiu a atividade da TryS de *L. infantum* com um IC<sub>50</sub> de 0,15µM e um EC<sub>50</sub> de 12,6µM contra formas promastigotas. Nesse mesmo trabalho, os autores mostraram o efeito *on target* desse composto

medindo os níveis de GSH e  $T(SH)_2$ , substratos da TryS, indicando que provavelmente o alvo do composto é a enzima (BENÍTEZ et al., 2016). De maneira parecida, Orban e colaboradores (2016) mostraram que 3-clorokenpaullones 5-substituídos apesar de não serem inibidores potentes da TryS de tripanossomatídeos, são capazes de inibir o crescimento de formas sanguíneas de *T. brucei* com  $EC_{50}$  de  $0,04\mu M$  e índice de seletividade de 1410. Recentemente, foi demonstrando que parasitos transgênicos de *T. cruzi* que superexpressam a TryS são resistentes ao peróxido de hidrogênio, Benzinidazol e Nifurtimox, entretanto quando tratados com  $30\mu M$  dos Paullones KuOrb39 e KuOrb54 se tornaram mais susceptíveis aos efeitos tóxicos dessas moléculas, ratificando o efeito protetor conferido pela TryS (MESÍAS et al., 2018).

## 2. JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

Para o tratamento da LCL, o medicamento de primeira escolha é o Sb<sup>v</sup>. Embora existam outros medicamentos como Anfotericina B, Miltefosina e Pentamidina, todos também apresentam limitações quanto à toxicidade (revisado por MISHRA; SAXENA; SINGH, 2007). Além disso, a literatura tem reportado falha terapêutica não só para o Sb<sup>v</sup>, como para os outros fármacos (PONTE-SUCRE et al., 2017). Diante do exposto, é urgente o desenvolvimento de novos compostos anti-*Leishmania*.

Em tripanossomatídeos, o sistema que controla a homeostase redox envolve a tripanotiona [T(SH)<sub>2</sub>], a tripanonotiona redutase (TR) e a triparredoxina (TXN), além de outras enzimas (revisado por COMINI; FLOHÉ, 2013). Por carecer de sistemas redox complementares como o da glutationa redutase/glutationa e tiorredoxina redutase/tiorredoxina, os tripanossomatídeos dependem exclusivamente de tripanotiona/TR/TXN para manter a homeostase redox intracelular. Dada a importância do metabolismo redox para a *Leishmania*, enzimas envolvidas nesse metabolismo podem ser alvo para o desenvolvimento de novos fármacos. Além disso, os componentes desse sistema estão ausentes em mamíferos (como por exemplo a tripanotiona) ou, se estão presentes, possuem diferenças estruturais e funcionais marcantes (por exemplo a TR e TXN). Sendo assim, nossa hipótese é que inibidores da enzima TryS exercem efeito leishmanicida, diminuindo a infecção por *L. braziliensis* *in vitro* e inibindo o desenvolvimento da LCL *in vivo*.

### 3. OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial terapêutico de inibidores da tripanotona sintetase na infecção por *Leishmania braziliensis*.

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar *in vitro*, o efeito de inibidores da tripanotona sintetase na infecção de macrófagos murinos por *L. braziliensis* quanto aos seguintes parâmetros:
  - a. Taxa de infecção
  - b. Alterações morfológicas das formas amastigotas
  - c. Produção de NO e ROS
  - d. Produção de citocinas
  - e. Quantificação de tióis e formas promastigotas e amastigotas de *L. braziliensis*
  
2. Avaliar *in vivo*, o efeito dos inibidores da tripanotona sintetase em modelo pré-clínico de leishmaniose cutânea localizada quanto aos seguintes parâmetros:
  - a. Desenvolvimento da lesão de animais infectados
  - b. Carga parasitária da orelha e do linfonodo
  - c. Produção de citocinas e quimiocinas nos linfonodos de drenagem

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 PAULLONES

Os Paullones N<sup>5</sup> substituídos (benzo[2,3]azepino[4,5-b]indol-6-ones) foram cedidos pelo Dr. Marcelo Comini (Instituto Pasteur de Montevideo). Os Paullones foram diluídos em DMSO (Sigma) e a concentração final dos diluentes não foi maior do que 1%.

### 4.2 PARASITAS

Promastigotas de *Leishmania braziliensis* (cepa MHOM/BR/01/BA788) e *Leishmania infantum* (cepa MHOM MA6717MAP263) foram cultivados em Schneider's Insect Medium (Sigma) e RPMI 1640 Glutamax, 25mM de HEPES pH 7,4 respectivamente. Ambos foram suplementados com 10% de soro bovino fetal (Gibco) e 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de streptomicina (Gibco) a 26°C.

### 4.3 ANIMAIS

Camundongos BALB/c fêmeas, com idade entre 6 e 8 semanas, foram fornecidos pelo biotério do Instituto Gonçalo Moniz - FIOCRUZ e mantidos em condições livre de patógenos. Todos os protocolos de experimentação utilizados neste trabalho foram aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais do IGM/FIOCRUZ sob o protocolo 16/2015.

### 4.4 ENSAIO DE ATIVIDADE DA TRYS

A atividade da TryS foi determinada por um ensaio de end-point baseado no reagente BIOMOL GREEN™ (Enzo Life Sciences) conforme descrito em Benítez e colaboradores (2016). Resumidamente, ATP foi usado a 150µM e SP fixado em 2mM, enquanto GSH foi ajustado para 0.25mM para evitar a inibição pelo substrato ou para abordar concentrações fisiológicas. Uma solução contendo todos os substratos a 1,25 vezes sua concentração final foi preparado no tampão de reação do rastreamento (5 mM DTT, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 0,5 mM EDTA, 100 mM HEPES pH 7,4). Em placas de 96 poços foram adicionados 5µL do composto testado, DMSO (controle de reação) ou um inibidor específico da TryS (controle de inibição) e 40µL da solução. As reações foram iniciadas adicionando 5µL da TryS e paradas após 15 minutos com 200µL do reagente BIOMOL GREEN™. As placas foram incubadas 20 minutos a temperatura

ambiente e lidas a 650nm em um leitor de placas MultiScan FC reader (Thermo Fisher SCIENTIFIC). Os brancos foram preparados para cada condição adicionando 5µL da reação de rastreamento ao invés de enzima. A interferência dos compostos com a reação colorimétrica foi avaliada em uma amostra contendo 20 µM K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> dissolvidas em solução e os valores de atividades foram corrigidos. Todas as condições foram realizadas pelo menos duas vezes.

#### 4.5 CÉLULAS

Macrófagos murinos da linhagem J774 (ATCC® TIB67™) foram cultivados em meio DMEM (Gibco) suplementando com 10% de soro bovino fetal, 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de streptomicina. Macrófagos murinos foram derivados de precursores obtidos da medula óssea de camundongos, conforme descrito por Marim e colaboradores (2010). Brevemente, o fêmur e a tíbia foram triturados em meio DMEM. A suspensão celular foi filtrada com Filcon70µM (BD) e as hemácias foram lisadas com solução de ACK (Ammonium-Chloride-Potassium) durante 5 minutos, a temperatura ambiente. A preparação foi centrifugada a 405 x g e ressuspendidas em meio DMEM. As células foram diferenciadas em placas de Petri, em meio DMEM suplementado com 10% de soro bovino fetal, 100U/mL de penicilina e 100µg/mL de streptomicina e 30% de sobrenadante de cultura de células L929 durante 7 dias, a 37° C, com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### 4.6 INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS E TRATAMENTO COM PAULLONES

Para os experimentos de rastreamento, 10<sup>5</sup> macrófagos (linhagem J774) foram semeados em meio DMEM suplementado, em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares. As células foram infectadas com *L. braziliensis* em fase estacionária por 24 horas, na proporção de 20 parasitas para 1 macrófago. As células foram tratadas com 10µM dos diferentes paullones por mais 24 horas. Para a determinação do EC<sub>50</sub> em amastigotas, 3 x 10<sup>5</sup> macrófagos derivados de medula óssea (MDMO) foram semeados em placas de 24 poços contendo lamínulas circulares, em meio DMEM suplementado durante 24 horas. As células foram infectadas com *L. braziliensis* em fase estacionária, na proporção de 10 parasitas para 1 macrófago por 24 horas. As células foram então tratadas com diferentes concentrações de Paullones ou com Anfotericina B 0.27µM (Gibco) por 24 horas. As lamínulas foram fixadas em metanol e posteriormente coradas com Panótico (Laborclin). A porcentagem de células

infectadas e de amastigotas em 100 células foi determinada por microscopia ótica. Para determinar o número de parasitas viáveis, após os diferentes tratamentos, o meio DMEM foi substituído por meio Schneider e as células mantidas a 26° C por 7 dias. As formas promastigotas móveis foram quantificadas em câmara de Neubauer no 7º dia após a substituição do meio, conforme descrito em Ribeiro-Gomes e colaboradores (2004).

#### 4.7 CURVA DE CRESCIMENTO DE *L. BRAZILIENSIS*

Promastigotas de *L. braziliensis* foram semeados em meio Schneider suplementado na densidade de  $3 \times 10^5$  parasitos e foram tratados com diferentes concentrações de um Paullone obtido a partir do screening. A proliferação dos parasitos foi avaliada por contagem em câmara de Neubauer em microscópio óptico por 5 dias.

#### 4.8 ENSAIO DE VIABILIDADE

Para avaliar a toxicidade dos Paullones em promastigotas de *L. braziliensis*, os parasitas ( $3 \times 10^5$ ) foram ressuspensos em meio Schneider suplementado e foram tratados com diferentes concentrações de KuRK259 por 72 horas. Em seguida, Alamar Blue (Sigma) foi adicionado na proporção de 10% (v/v) e os parasitas foram incubados por 4 horas a 26° C. Para avaliar a viabilidade dos macrófagos murinos, as células ( $3 \times 10^5$ ) foram ressuspensas em meio DMEM suplementado e semeadas em placas de 48 poços. As células foram tratadas com diferentes concentrações de KuRK259 por 24 horas. Em seguida, Alamar Blue foi adicionado na proporção de 10% (v/v) e as células foram incubadas por 4 horas a 37° C, com 5% de CO<sub>2</sub>. A viabilidade foi avaliada por densidade ótica em espectrofotômetro (Molecular Devices) nos comprimentos de onda de 570-600nm.

#### 4.9 DOSAGEM DE CITOCINAS

Os macrófagos derivados de medula óssea ( $10^6$ ) foram infectados com *L. braziliensis* e tratados com KuRK259 como descrito acima. Após 24 horas os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -20° C. Os linfonodos de animais infectados e tratados com o KuRK259 foram processados e as células ( $3 \times 10^6$ ) cultivados por 48 horas e os sobrenadantes coletados e armazenados a -20° C. ConA foi utilizado como controle positivo para cada um dos linfonodos dos animais. Os níveis

das citocinas foram quantificadas utilizando o kit *Mouse Inflammatory* (BD Biosciences), conforme as instruções dos fornecedores. Os dados foram adquiridos utilizando citômetro de fluxo Fortessa e as análises foram feitas no Software FlowJo.

#### 4.10 DOSAGEM DE NO

Sobrenadantes de cultura de macrófagos infectados com *L. braziliensis* ( $5 \times 10^5$  células em 250 $\mu$ L de DMEM suplementado) tratados com KuRK259 e estimulados com 100ng/mL de LPS (Invivogen) por 24 horas foram analisados quanto a produção de nitrito utilizando a reação de Griess, como uma medida indireta da produção de NO (Green et al., 1982). Para medir a produção de nitrito, alíquotas de 50 $\mu$ L das amostras foram incubadas com 50 $\mu$ L dos reagentes (25 $\mu$ L da solução de sulfanilamida 1% e 25 $\mu$ L de solução de N-naphthileneduaminedihidrochloridre 0,1% em 2,5% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>). A densidade ótica foi avaliada no espectrofotômetro no comprimento de onda de 560nm.

#### 4.11 DOSAGEM DE ROS

Macrófagos murinos infectados ou não com *L. braziliensis* foram tratados por 30 minutos ou 2 horas com KuRK259 em diferentes concentrações e a produção de ROS foi mensurada por citometria de fluxo usando a sonda DHE. PMA foi utilizado como controle positivo.

#### 4.12 MICROSCOPIA ELETRÔNICA

Macrófagos murinos derivados de medula óssea foram infectados com *L. braziliensis* e tratados com KuRK259, como descrito acima. As células foram fixadas com glutaraldeído 2,5% e paraformaldeído 2% em tampão cacodilato de sódio 0.1M, pH 7.4 e armazenados a 4°C. Posteriormente, as amostras foram lavadas em cacodilato de sódio 0.1M e pós fixadas em tetróxido de ósmio 1% ao abrigo da luz. Em seguida, foram realizadas novas lavagens em cacodilato de sódio 0.1M e as amostras foram desidratadas em concentrações crescentes de acetona. Por fim, as amostras foram mantidas em resina e cortadas em secções ultrafinas para observação. O material foi observado e fotografado em microscópio Jeol 1230.

#### 4.13 DOSAGEM DE TRIPANOTIONA E GLUTATIONA

O método utilizado no presente estudo é uma versão modificada de Fairlamb (1987). Macrófagos J774 ( $3 \times 10^6$ ) foram aderidos por 24 horas. As células foram então



infectadas com promastigotas estacionários de *L. braziliensis* na proporção de 40 parasitos para 1 macrófago por mais 24 horas. As células foram tratadas com KuRK259 na concentração de 6 $\mu$ M por 24 horas. As células foram então coletadas e centrifugadas a 2500 x g por 10 minutos a temperatura ambiente. As amostras foram lavadas com PBS e ressuspensas em uma densidade  $\geq 1.0 \times 10^7$  células / 0.1mL de HEPES 40mM, pH 8. Em seguida, as amostras foram reduzidas durante 1 hora a temperatura ambiente com NaBH<sub>4</sub> 70mM e após esse período foram adicionados 2mM de monobromobimano. As amostras foram incubadas a 70° C por 3 minutos e colocadas em gelo. Foram adicionados 100 $\mu$ l de ácido metassulfônico 4M e as amostras incubadas overnight a 4° C. Os sobrenadantes contendo os tióis de baixo peso molecular derivados foram centrifugados a 13000 x g por 40 minutos a 0° C e o sobrenadante resultante foi analisado por HPLC.

#### 4.14 CLONAGEM, TRANSFEÇÃO E SELEÇÃO DE *L. INFANTUM* REDOX-REPORTER

A sequência da hGrx-roGFP2 foi isolada do vetor pBinCM-Grx-roGFP2 (cedido por Dr. Andreas Meyer, Heidelberg Institut for Plant Science, Universität Heidelberg, Germany) por PCR com os seguintes primers: Fo Grx-roGFP HindIII (5'-GCTAAGCTTATGGCTCAAGAGTTTGTG-3'/ Re roGFP BamHI (5'-TGGATCCCCCGGGTTACTTGTAC-3') e Fo Grx-roGFP NotI (5'-TAGCGGCCGCATGGCTCAAGAGTTTGTG-3'/ Re roGFP BamHI). A digestão e a clonagem da construção pLexsy-hyg2 hGrx-roGFP2 foi feita com as enzimas NcoI/NotI da Genscript. O vetor pLexsy-hyg2 foi adquirido da Jena Biociences. 10<sup>7</sup> promastigotas de *L. infantum* em fase logarítmica foram transfectados com 20 $\mu$ g do plasmídeo pLexsy-hyg2 hGrx-roGFP2 linearizado usando o Parasite Solution e Amaxa Nucleofector (Lonza) ajustado na programação U-033. Os parasitos transfectados foram transferidos para meio fresco e incubados por 24 horas. Higromicina 30 $\mu$ g/mL foi adicionado ao meio e a seleção dos transformantes acompanhada por duas semanas.

Parasitas expressando hGrx-roGFP2, em fase log (10<sup>6</sup> – 10<sup>7</sup>), foram incubados com o KuRK259 na concentração de 3,5 $\mu$ M por 24 horas e analisados por citometria de fluxo (BD FACSAria™ Fusion) usando os lasers 405nm e 488nm e os filtros 525/50nm e 530/50nm, respectivamente. Ditioneitol (DTT) 2mM e diamida 250 $\mu$ M foram usados como controles negativos e positivos, respectivamente e foram

aplicados 10 minutos antes das amostras serem analisadas. Aproximadamente 10 mil eventos foram adquiridos para cada amostra. Os dados foram processados e analisados no Flowjo.

#### 4.15 ENSAIO IN VIVO

Camundongos BALB/c foram infectados na orelha, por via intradérmica, com *L. braziliensis* estacionárias ( $10^5$  parasitas em 10 $\mu$ l de salina) utilizando agulha de insulina (30G) (BD Ultra-fina<sup>TM</sup>) (DE MOURA et al, 2005). Quatro semanas após a infecção, 10 $\mu$ l de salina contendo 30 $\mu$ M ou 60 $\mu$ M de KuRK259 (7,8 $\mu$ g/kg e 15,7 $\mu$ g/kg respectivamente) foram aplicados nas lesões dos camundongos infectados utilizando agulha de insulina, três vezes por semana até a décima semana. Animais controle foram tratados por via intraperitoneal, três vezes por semana com Sb<sup>v</sup> na dose de 50mg/kg. O tamanho da lesão foi avaliado semanalmente utilizando paquímetro digital (Fisher Brand). Camundongos controle receberam 10 $\mu$ l de salina contendo 0.4% de DMSO. Dez semanas após a infecção, a carga parasitária foi determinada através do ensaio quantitativo de diluição limitante (TITUS et al., 1985). Para isto, as orelhas infectadas e os linfonodos drenantes foram removidas e homogeneizadas em meio RPMI. As células obtidas foram diluídas seriadamente em meio Schneider suplementado e distribuídas em triplicatas em placas de 96 poços. O número de parasitas viáveis foi estimado através da máxima diluição na qual promastigotas de *Leishmania* foram observadas após uma semana de incubação a 26°C.

#### 4.16 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As comparações entre dois grupos foram feitas pelo teste Mann-Whitney (teste T não paramétrico). Os dados são apresentados como média  $\pm$  desvio padrão. O cálculo da EC<sub>50</sub> em promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* e da EC<sub>50</sub> em macrófagos murinos foi determinada por regressão sigmoidal das curvas de dose-resposta. O índice de seletividade de KuRK259 foi calculado através da razão entre EC<sub>50</sub> em macrófagos murinos e EC<sub>50</sub> em amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*. Para análise do desenvolvimento da doença em animais tratados, a espessura das orelhas infectadas foi avaliada semanalmente em cada animal. O curso da doença no grupo KuRK259 e controle foi tabulado individualmente e a área sob a curva (AUC) obtida de cada animal foi analisada pelo teste não paramétrico Mann-

Whitney. Todas as análises foram feitas utilizando o software GraphPad (Prism) e um  $p \leq 0,05$  foi considerado significativo.

## 5. RESULTADOS

### 5.1 EFEITO DE DIFERENTES PAULLONES NA ATIVIDADE DA TRYPS DE *L. INFANTUM*

Inicialmente, realizamos experimentos para identificar Paullones capazes de inibir a atividade da TryS de *L. infantum* (Tabela I), empregando uma proteína recombinante. Neste experimento 30 $\mu$ M dos diferentes Paullones foram incubados com a TryS e seus substratos por 15 minutos. Em seguida o reagente de parada foi adicionado e as amostras foram analisadas em um leitor de placas para quantificação da atividade da TryS.

**Tabela I. Inibição da tripanotona sintetase (TryS) por 3-chlorokenpaullones  $N^5$ -substituídos**

Composto	Substituição - $N^5$	% de inibição da TryS a 30 $\mu$ M <sup>a</sup>	$IC_{50}$ ( $\mu$ M) <sup>b,c</sup>
		$L\bar{T}ryS$	$L\bar{T}ryS$
KuRK19	H	NA	
KuOrb88	CH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> OH		<b>~ 30</b>
KuRK114	-2-CH <sub>2</sub> -3-( dietoximetil)-1-( fenilsulfonil)-1H- pirrol	29.4 $\pm$ 12.7	
KuRK118	<b>CH<sub>2</sub>CO-OH</b>	NA	
KuRK60	<b>CH<sub>2</sub>CO-O-CH<sub>3</sub></b>		<b>3.0 <math>\pm</math> 0.7</b>
KuRK174	<b>CH<sub>2</sub>CO-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub></b>	36.2 $\pm$ 3.6	
KuRK107	<b>CH<sub>2</sub>CO-O-<i>tert</i>-butil</b>		<b>2.4 <math>\pm</math> 0.3</b>
KuOrb76	<b>CH<sub>2</sub>CO-NH<sub>2</sub></b>		<b>5.1 <math>\pm</math> 0.5</b>
KuRK197	<b>CH<sub>2</sub>CO-NH-NH<sub>2</sub></b>		<b>4.0 <math>\pm</math> 0.5</b>
KuOrb64	<b>CH<sub>2</sub>CO-NH-CH<sub>3</sub></b>		<b>0.75 <math>\pm</math> 0.13</b>
KuOrb115	<b>CH<sub>2</sub>CO-N-(CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>		<b>0.51 <math>\pm</math> 0.04</b>
KuOrb66	<b>CH<sub>2</sub>CO-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub></b>		<b>1.5 <math>\pm</math> 0.2</b>
KuOrb62	<b>CH<sub>2</sub>CO-N-(CH<sub>2</sub>CH<sub>3</sub>)<sub>2</sub></b>		<b>0.50 <math>\pm</math> 0.13</b>
KuRK279	<b>CH<sub>2</sub>CO-1-pirrolidinil</b>		<b>0.52 <math>\pm</math> 0.20</b>
KuRK270	<b>CH<sub>2</sub>CO-1-piperidinil</b>	38.6 $\pm$ 1.3	
KuOrb59	<b>CH<sub>2</sub>CO-N-H-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>OH</b>		<b>2.3 <math>\pm</math> 0.3</b>
KuRK278	<b>CH<sub>2</sub>CO-4-morfolinil</b>		<b>2.8 <math>\pm</math> 0.7</b>
KuOrb108	<b>CH<sub>2</sub>CO-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-4- morfolinil</b>		<b>3.3 <math>\pm</math> 0.1</b>
KuOrb63	<b>CH<sub>2</sub>CO-NH-C-(CH<sub>2</sub>OH)<sub>3</sub></b>		<b>5.2 <math>\pm</math> 0.4</b>
KuOrb61	<b>CH<sub>2</sub>CO-NH-<i>tert</i>-butil</b>		<b>2.3 <math>\pm</math> 0.4</b>
KuOrb111	<b>CH<sub>2</sub>CO-NH-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-O-CH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>NH-BOC</b>	31.7 $\pm$ 1.0	
	<b>CH<sub>2</sub>CO-(NHCH<sub>2</sub>CH<sub>2</sub>-NR<sub>1</sub>,R<sub>2</sub>)</b>		
KuRK258	R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> = H		<b>0.27 <math>\pm</math> 0.02</b>
KuRK259	(1-piperazinil)		<b>0.31 <math>\pm</math> 0.03</b>
MOL2008 <sup>d</sup>	R <sub>1</sub> = H, R <sub>2</sub> = CH <sub>3</sub>		<b>0.15 <math>\pm</math> 0.57</b>
KuRK269	(1-piperazinil-4-CH <sub>3</sub> )		<b>0.40 <math>\pm</math> 0.07</b>
KuOrb106	R <sub>1</sub> , R <sub>2</sub> = CH <sub>2</sub> CH <sub>3</sub>		<b>0.46 <math>\pm</math> 0.12</b>
KuOrb109	(NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -1-piperidil)		<b>0.79 <math>\pm</math> 0.08</b>
KuOrb119	(NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -1-piperazinil)		<b>0.63 <math>\pm</math> 0.1</b>
KuOrb110	(NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -1-piperazinil-4-metil)		<b>1.12 <math>\pm</math> 0.29</b>
KuOrb107	(1-piperazinil -4-2-pirimidine)		<b>12.5 <math>\pm</math> 0.2</b>
KuOrb116	(NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> -1-piperazinil-BOC)		<b>~ 30</b>
KuRK256	(NHCH <sub>2</sub> CH <sub>2</sub> NH-BOC)	36.7 $\pm$ 5.9	
KuRK249	(1-piperazinil-4-BOC)		<b>~ 30</b>
KuOrb120	<b>CH<sub>2</sub>CO-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH-NH<sub>2</sub></b>		<b>0.39 <math>\pm</math> 0.12</b>
KuOrb117	<b>CH<sub>2</sub>CO-NH(CH<sub>2</sub>)<sub>4</sub>-NH-BOC</b>		<b>~ 30</b>
	<b>CH<sub>2</sub>CO-NHR<sub>1</sub></b>		
KuOrb65	R <sub>1</sub> = 2-1,3,4-tiadiazolil		<b>~ 30</b>
KuOrb77	R <sub>1</sub> = 2-4,5- dihidrotiazolil		<b>~ 30</b>
KuOrb78	R <sub>1</sub> = 2-oxazolil		<b>20.1 <math>\pm</math> 1.5</b>
KuRK268	R <sub>1</sub> = phenil		<b>~ 30</b>

<sup>a</sup> Inibição da enzima é expressa como % de inibição da TryS  $\pm 2\sigma^{n-1}$ . <sup>b</sup> Valores de  $IC_{50}$  com seu correspondente desvio padrão ( $\pm 2\sigma^{n-1}$ ) estão marcados em itálico e negrito.

<sup>c</sup> Para os compostos que inibiram a TryS em  $50 \pm 5\%$  a 30 $\mu$ M, um  $IC_{50}$  de **~ 30 $\mu$ M** foi assumido. <sup>d</sup> Dados publicados em Benítez et al. 2016. NA, não ativo (inibição da enzima a 30  $\mu$ M é < 95%). BOC se refere ao grupo *tert*-butiloxicarbonil.

## 5.2 EFEITO BIOLÓGICO DE DIFERENTES PAULLONES CONTRA FORMAS AMASTIGOTAS DE *L. BRAZILIENSIS*.

A partir dos resultados obtidos, foram selecionados os Paullones que apresentaram uma atividade inibitória promissora, com o  $IC_{50} \leq 5 \mu M$  e atividade contra as formas sanguíneas de *T. brucei* (não mostrado). Estes foram testados quanto à sua capacidade de diminuir a infecção por *L. braziliensis*. Para isso, macrófagos infectados com *L. braziliensis* foram tratados com diferentes Paullones durante 24 horas e a porcentagem de macrófagos infectados foi determinada. Dos 16 compostos avaliados, cinco (KuRK278, MOL2008, KurK259, KuOrb106 e KuOrb109) reduziram a taxa de infecção em torno de 50%, quando utilizadas concentrações iguais ou menores que  $10 \mu M$  (Tabela II).

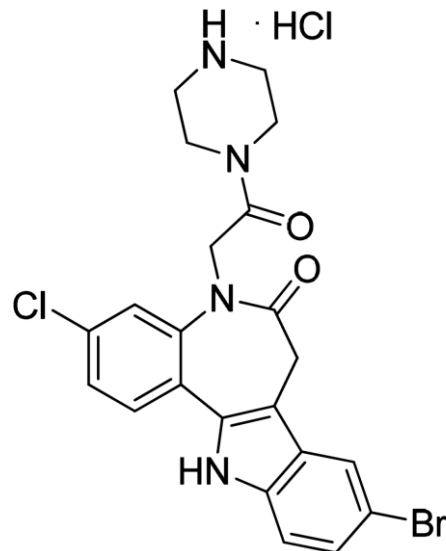
**Tabela II. Efeito biológico dos 3-chlorokenpaullones  $N^5$ -substituídos sobre macrófagos infectados com *L. braziliensis***

Composto	Substituição - $N^5$	macrófagos	
		Redução da infecção a $10 \mu M^a$ (%)	Citotoxicidade a $100 \mu M^b$ (%) ou $CL_{50}$ ( $\mu M$ )
KuRK19	H	ND	0 a $200 \mu M$
KuRK107	$CH_2CO-O-tert$ -butil	$11 \pm 13$	$64 \pm 0$
KuRK197	$CH_2CO-NH-NH_2$	$16 \pm 11$	$2 \pm 0$
KuOrb64	$CH_2CO-NH-CH_3$	$7 \pm 2$	$93 \pm 4$
KuOrb115	$CH_2CO-N-(CH_3)_2$	$28 \pm 4$ a $5 \mu M$	$21 \pm 1$
KuOrb62	$CH_2CO-N-(CH_2CH_3)_2$	$18 \pm 14$	$24 \pm 8$
KuRK279	$CH_2CO-1$ -pirrolidinil	$32 \pm 8$	$69 \pm 0$
KuRK278	$CH_2CO-4$ -morfolinil	$71 \pm 3$	<b><math>10.2 \pm 0.2</math></b>
KuOrb61	$CH_2CO-NH-tert$ -butil	$-4 \pm 1$	$48 \pm 8$
KuRK258	$CH_2CO-NHCH_2CH_2-NH_2$	$32 \pm 1$	$36 \pm 1$
MOL2008	$CH_2CO-NHCH_2CH_2-NH-CH_3$	$48 \pm 10$	<b><math>10.3 \pm 0.1</math></b>
KuRK259	$CH_2CO-NH-1$ -piperazinil	$85 \pm 1$ a $5 \mu M$	<b><math>8.1 \pm 0.1</math></b>
KuRK269	$CH_2CO-NH-1$ -piperazinil-4- $CH_3$	$35 \pm 7$	<b><math>35.5 \pm 0.1</math></b>
KuOrb106	$CH_2CO-NHCH_2CH_2-NH-(CH_2CH_3)_2$	$62 \pm 1$ a $5 \mu M$	<b><math>6.0 \pm 1.0</math></b>
KuOrb109	$CH_2CO-NHCH_2CH_2-1$ -piperidil	$51 \pm 3$ a $5 \mu M$	<b><math>9.0 \pm 1.0</math></b>
KuOrb119	$CH_2CO-NHCH_2CH_2-1$ -piperazinil	$-39 \pm 2$	$24 \pm 3$
KuOrb120	$CH_2CO-NH(CH_2)_4-NH_2$	$-16 \pm 3$	0
Anfotericina B			$8.9 \pm 0.5$

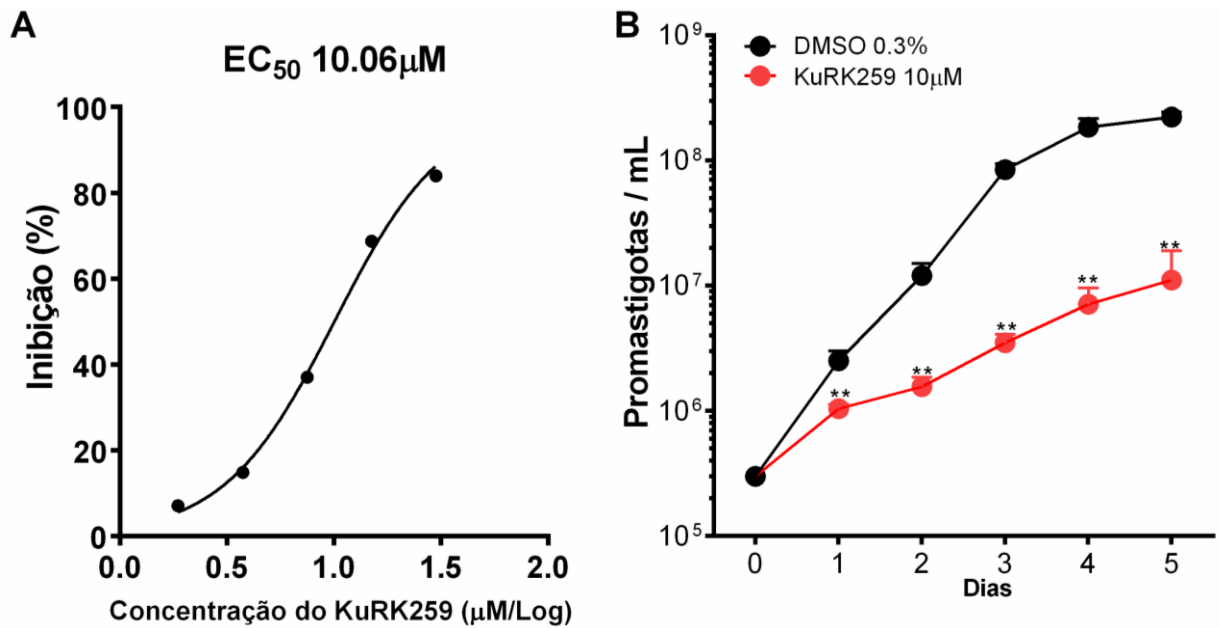
<sup>a</sup>porcentagem de redução da infecção de macrófagos infectados por *L. braziliensis* e tratados com Paullones a pelo menos  $10 \mu M$ . Os valores são expressos em relação a macrófagos infectados e não tratados. <sup>b</sup>citotoxicidade dos Paullones contra macrófagos não infectados e tratados. ND, não determinado.

### 5.3 EFEITO BIOLÓGICO DO KURK259 CONTRA FORMAS PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS DE *L. BRAZILIENSIS*.

Entre os cinco Paullones que apresentaram melhor desempenho no ensaio leishmanicida *in vitro* (KuRK278, MOL2008, KurK259, KuOrb106 e KuOrb109), o fármaco KuRK259 (Figura 3) mostrou efeito biológico mais potente, reduzindo a taxa de infecção em 85%, quando comparado ao controle. A partir destes resultados, decidimos inicialmente avaliar o efeito deste Paullone sobre promastigotas de *L. braziliensis*. Para isso, os parasitos foram cultivados em diferentes concentrações de KuRK259 e a proliferação foi avaliada por Alamar blue. Nós encontramos um EC<sub>50</sub> de 10,06µM, com um intervalo de confiança de 95% entre 8,94µM e 11,32µM para as formas promastigotas (Figura 4A), indicando o efeito leishmanicida deste Paullone. Para confirmação do EC<sub>50</sub>, o fármaco foi testado nos parasitos utilizando-se somente a concentração de 10µM e a proliferação foi avaliada por contagem em câmara de Neubauer durante 5 dias. De fato, observamos um número menor de parasitos a partir do primeiro dia de contagem (Figura 4B), confirmando a capacidade de KurK259 de inibir o crescimento de *L. braziliensis*.



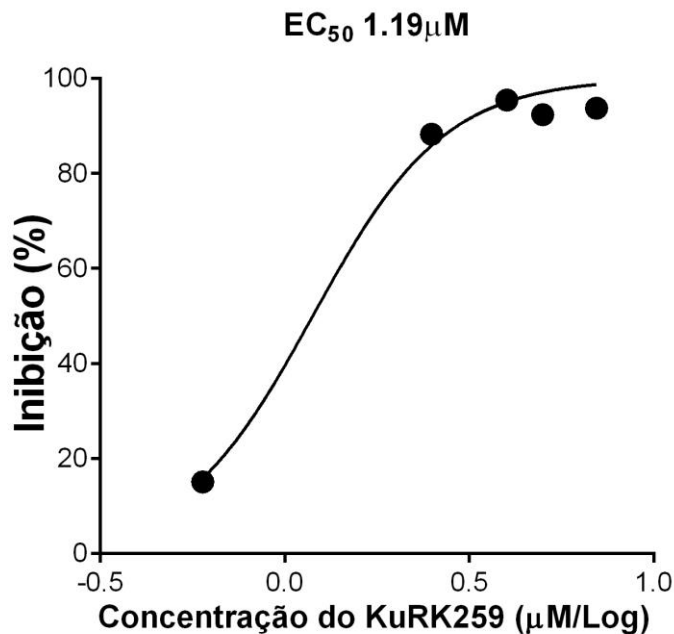
**Figura 3.** Estrutura química do KuRK259.



**Figura 4. Efeito biológico de KuRK259 contra promastigotas de *L. braziliensis*.** Promastigotas foram cultivados em diferentes concentrações do KuRK259 e a viabilidade dos parasitos avaliada após 72 horas para a determinação do EC<sub>50</sub> (A). *L. braziliensis* foi cultivado na presença de 10µM do KuRK259 e a quantidade de parasitos foi avaliada diariamente durante 5 dias por contagem em câmara de Neubauer (B). Para o cálculo do EC<sub>50</sub> as concentrações do KuRK259 utilizadas foram de 1,8µM; 3,75µM; 7,5µM; 15µM; 30µM. R<sup>2</sup> = 0.9964. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão e são relativos a um experimento, realizado três vezes. \*\*, p<0,01.

Em seguida, avaliamos o efeito de KuRK259 sobre as formas amastigotas. Assim, macrófagos infectados com *L. braziliensis* foram tratados com diferentes concentrações do KuRK259 e a porcentagem de células infectadas e de amastigotas por 100 células foi avaliada por microscopia ótica. A partir deste ensaio, determinamos um EC<sub>50</sub> de 1.19µM, com intervalo de confiança de 95% entre 0,9µM e 1.6µM (Figura 5).

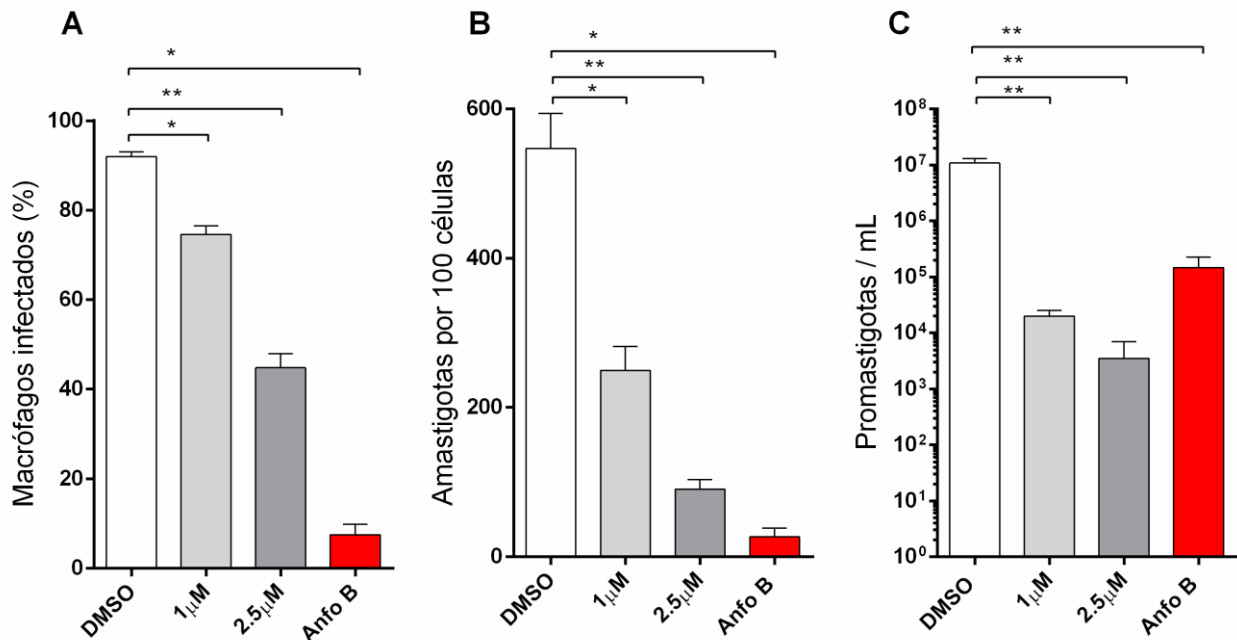




**Figura 5. EC<sub>50</sub> do KuRK259 para as formas amastigotas de *L. braziliensis*.** Macrófagos foram infectados com *L. braziliensis* e tratados com diferentes concentrações do KuRK259 por 24 horas. Em seguida o número de amastigotas foi determinado para cada uma das concentrações por microscopia ótica e o EC<sub>50</sub> determinado. Para o cálculo do EC<sub>50</sub> as concentrações do KuRK259 utilizadas foram de 0,6µM; 2,5µM; 4µM; 5µM; 7µM. R<sup>2</sup> =0.9890. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão e são relativos a um experimento, realizado duas vezes.

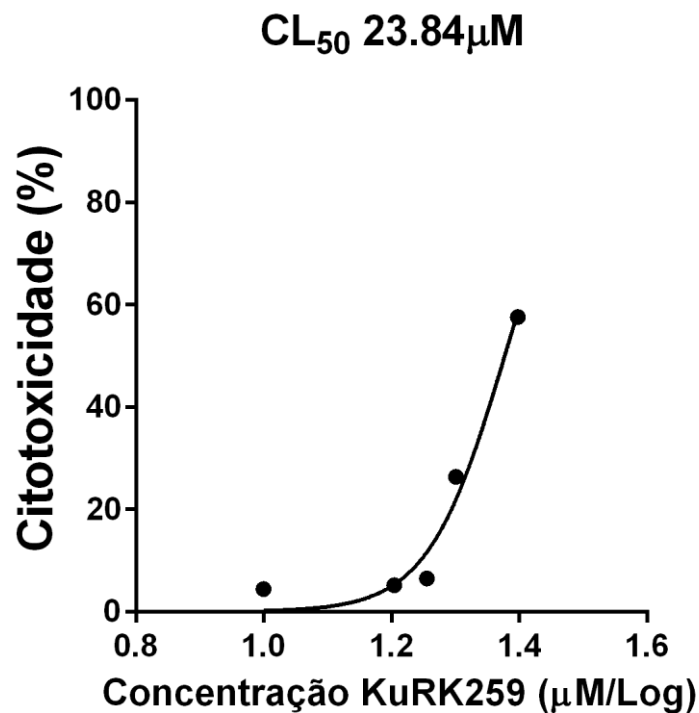
Realizamos então novos ensaios de infecção *in vitro*, empregando duas concentrações de KuRK259, 1µM e 2,5µM. Neste ensaio, observamos que a concentração de 1µM reduziu a porcentagem de macrófagos infectados em 20%, enquanto a concentração de 2,5µM reduziu em 53% (Figura 6A). Por outro lado, quando avaliamos o número de amastigotas por 100 células, observamos que tanto a concentração de 1µM quanto a concentração de 2,5µM foram capazes de reduzir o número de amastigotas de maneira significativa em 54% e 84%, respectivamente (Figura 6B). De maneira similar, o crescimento de promastigotas a partir de macrófagos infectados e tratados com KuRK259 também foi significativamente menor nas duas concentrações testadas (Figura 6C). Nós também observamos que a anfotericina B na concentração de 0,27µM foi capaz de diminuir a porcentagem de macrófagos infectados, bem como a quantidade de amastigotas. Estes resultados

indicam que KuRK259 inibe o crescimento das formas promastigotas de *L. braziliensis* e reduz a porcentagem de infecção e a quantidade de amastigotas em macrófagos.



**Figura 6. Efeito biológico do KuRK259 em amastigotas de *L. braziliensis*.** Macrófagos foram infectados e tratados com o KuRK259 em diferentes concentrações. A porcentagem de macrófagos infectados (A) e amastigotas por 100 células (B) foram determinados por microscopia óptica após 24h. Os macrófagos infectados e tratados foram cultivados em meio Schneider e o número de promastigotas foi determinado após 7 dias (C). Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão e são relativos a um experimento, realizado três vezes. \*,  $p < 0,05$ . \*\*,  $p < 0,01$ .

Em seguida, avaliamos o índice de seletividade de KuRK259. Os macrófagos foram tratados com diferentes concentrações de KuRK259 por 24 horas e a viabilidade das células foi avaliada por Alamar Blue. Assim, determinamos um  $CL_{50}$  de 23,84 μM para macrófagos não infectados com um intervalo de confiança de 95% entre 22,22 μM e 25,58 μM e um índice de seletividade de 20 (Figura 7).

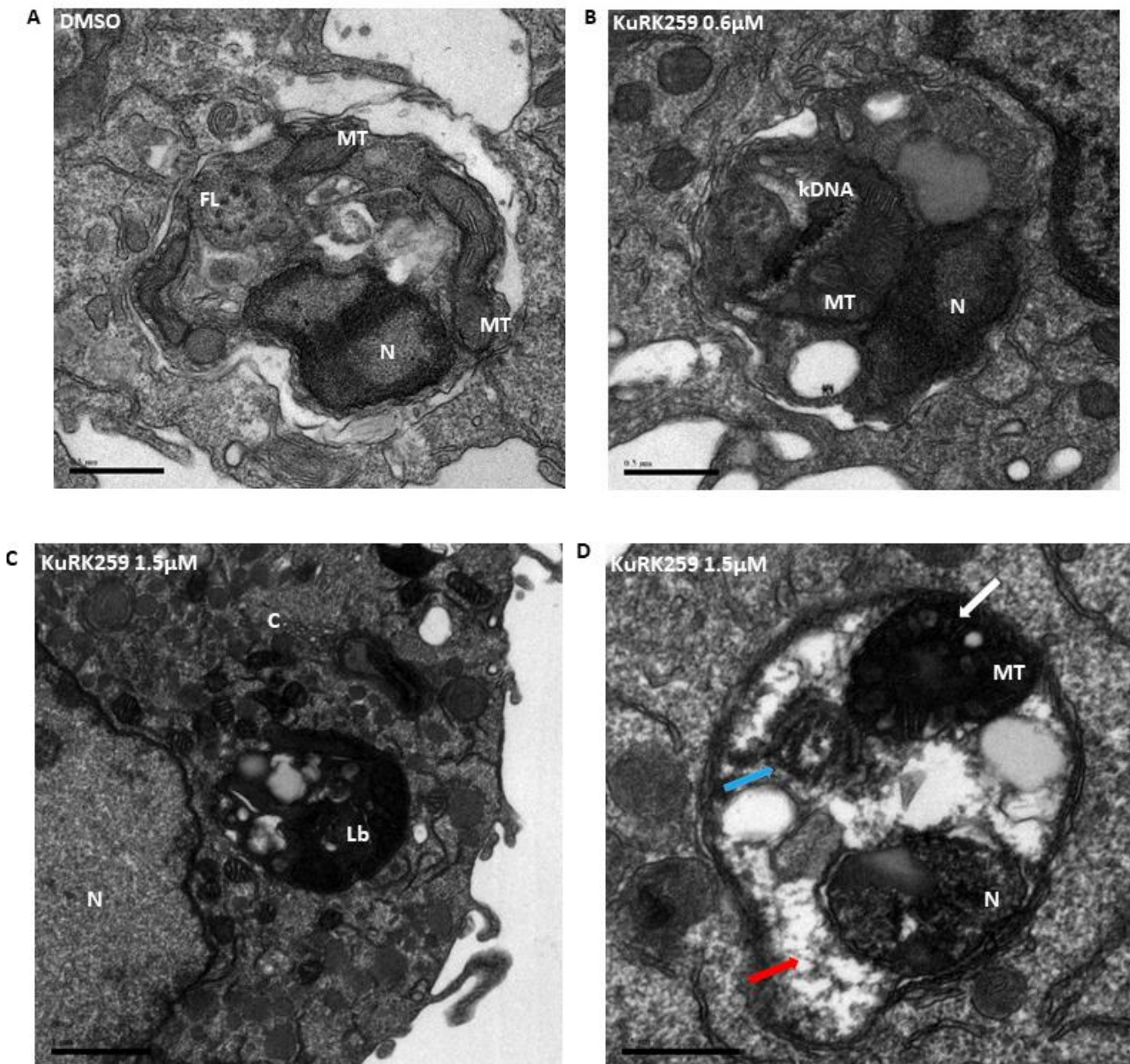


**Figura 7. CL<sub>50</sub> do KuRK259 para macrófagos não infectados e índice de seletividade.** Macrófagos foram tratados com KuRK259 por 24h e a toxicidade foi avaliada por Alamar blue para a determinação do CL<sub>50</sub>. O índice de seletividade foi determinado pela razão entre o CL<sub>50</sub> dos macrófagos / EC<sub>50</sub> dos amastigotas. Para o cálculo do CL<sub>50</sub> as concentrações do KuRK259 utilizadas foram de 10μM; 16μM; 18μM; 20μM; 25μM. R<sup>2</sup> = 0.9693. Os dados estão apresentados como média e são relativos a um experimento, realizado três vezes.

#### 5.4 ALTERAÇÕES ESTRUTURAIS EM AMASTIGOTAS DE *L. BRAZILIENSIS* TRATADOS COM O KURK259

Anteriormente mostramos que o tratamento de macrófagos infectados com KuRK259 reduz a carga parasitária e inibe o crescimento dos parasitas. Desta forma, nós avaliamos as alterações estruturais nas formas amastigotas após o tratamento. Macrófagos infectados com *L. braziliensis* foram tratados com diferentes concentrações de KuRK259 e em seguida as células foram processadas para avaliação por microscopia eletrônica de transmissão (Figura 8). Após 24 horas, os parasitos das células tratadas com DMSO (veículo) apresentaram uma boa preservação do material, sem alterações estruturais e organelas bem definidas (Figura 8A). As células tratadas com KuRK259, na concentração de 0,6μM mostraram sinais iniciais de morte celular das formas amastigotas tais como dilatação mitocondrial, menor individualização das organelas citoplasmáticas e vacuolização (Figura 8B).

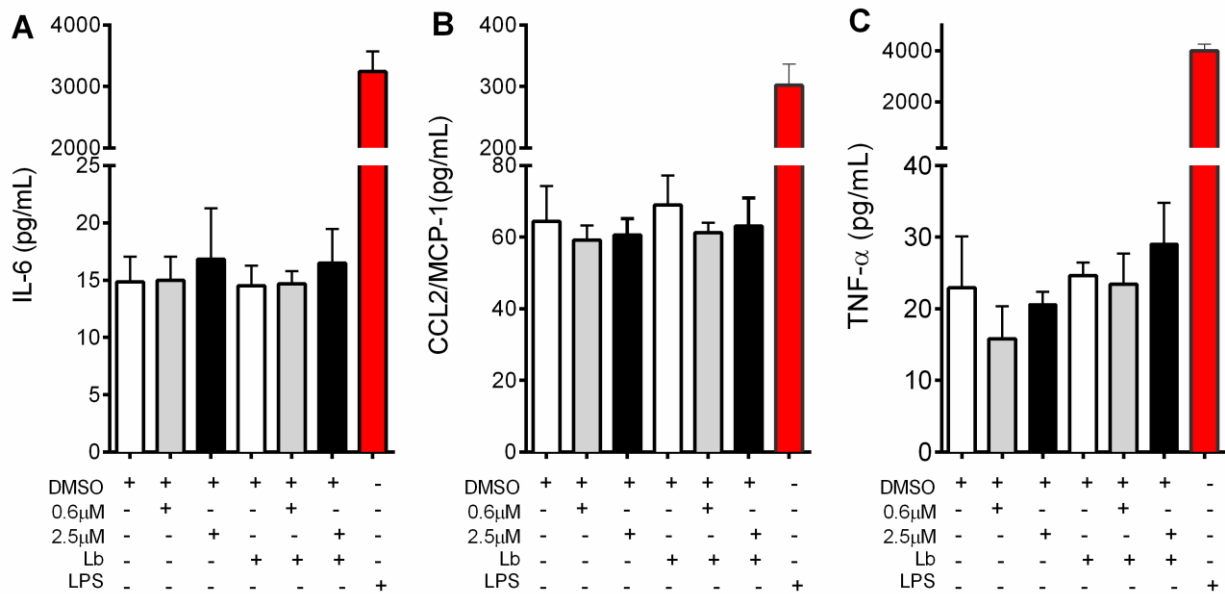
Quanto à célula hospedeira, observamos uma boa preservação do material, sem alterações estruturais e boa individualização das organelas em todas as concentrações testadas (Figura 8C). Já as células tratadas com 1,5 $\mu$ M mostraram que os amastigotas apresentaram morte celular em estágio avançado com destruição do parasito, degradação do citoplasma (seta azul), dilatação mitocondrial (seta branca), intensa vacuolização (seta vermelha), condensação citoplasmática além perda de individualização das organelas citoplasmáticas (Figura 8D). Sendo assim, esses resultados nos mostram que o KuRK259, nas concentrações utilizadas, levou à morte seletiva do parasito sem causar danos estruturais à célula hospedeira.



**Figura 8. Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos infectados e tratados com KuRK259.** Macrófagos foram infectados com *L. braziliensis* e tratados com DMSO 0,16% (A), KuRK259 0,6 $\mu$ M (B) e KuRK259 1,5 $\mu$ M (C e D) por 24 horas. Em seguida as células foram processadas para observação em microscópio eletrônico de transmissão Zeiss EM 109. Magnificação (A) 50000x, (B) 50000x (C) 50000x e (D) 60000x. As setas indicam as alterações celulares, FL – Flagelo, MT – Mitocôndria, N – Núcleo, C – Citoplasma, Lb – *Leishmania braziliensis*.

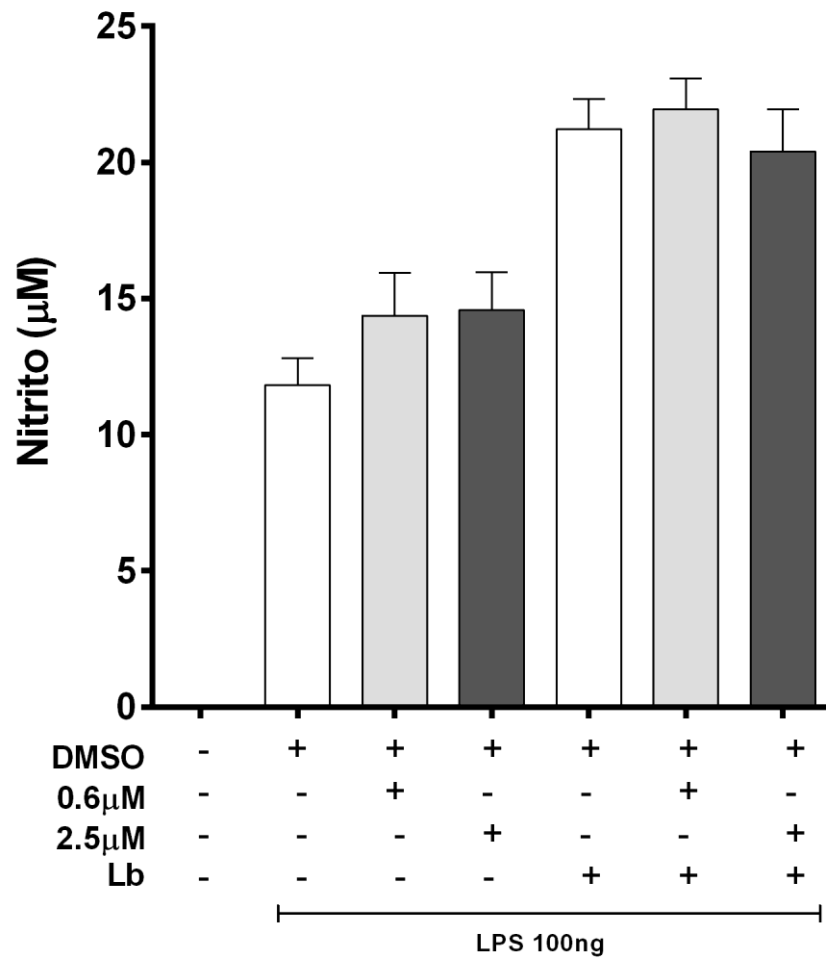
## 5.5 PRODUÇÃO DE CITOCINAS, ÓXIDO NÍTRICO E ROS POR MACRÓFAGOS INFECTADOS TRATADOS COM KURK259.

Uma resposta Th1 caracterizada pela produção de citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF é essencial para ativar os macrófagos, levando à eliminação da leishmania (PINHEIRO; ROSSI-BERGMANN, 2007; THEODOS et al., 1991; WILHELM et al., 2001a). Assim, nós também avaliamos a produção de citocinas após o tratamento dos macrófagos infectados com KuRK259. As células foram infectadas com *L. braziliensis* e tratadas com 0,6 $\mu$ M e 2,5 $\mu$ M de KuRK259. A produção de citocinas foi avaliada no sobrenadante das culturas. O tratamento com KuRK259 não induziu a produção de IL-6, CCL2 ou de TNF (Figura 9, A-C). Além disso, também não detectamos aumento na produção de IL-10 ou IL-12. Estes resultados indicam que a diminuição na porcentagem de macrófagos infectados e no número de amastigotas resultantes do tratamento com KuRK259 não apresentam relação com a produção destas citocinas.



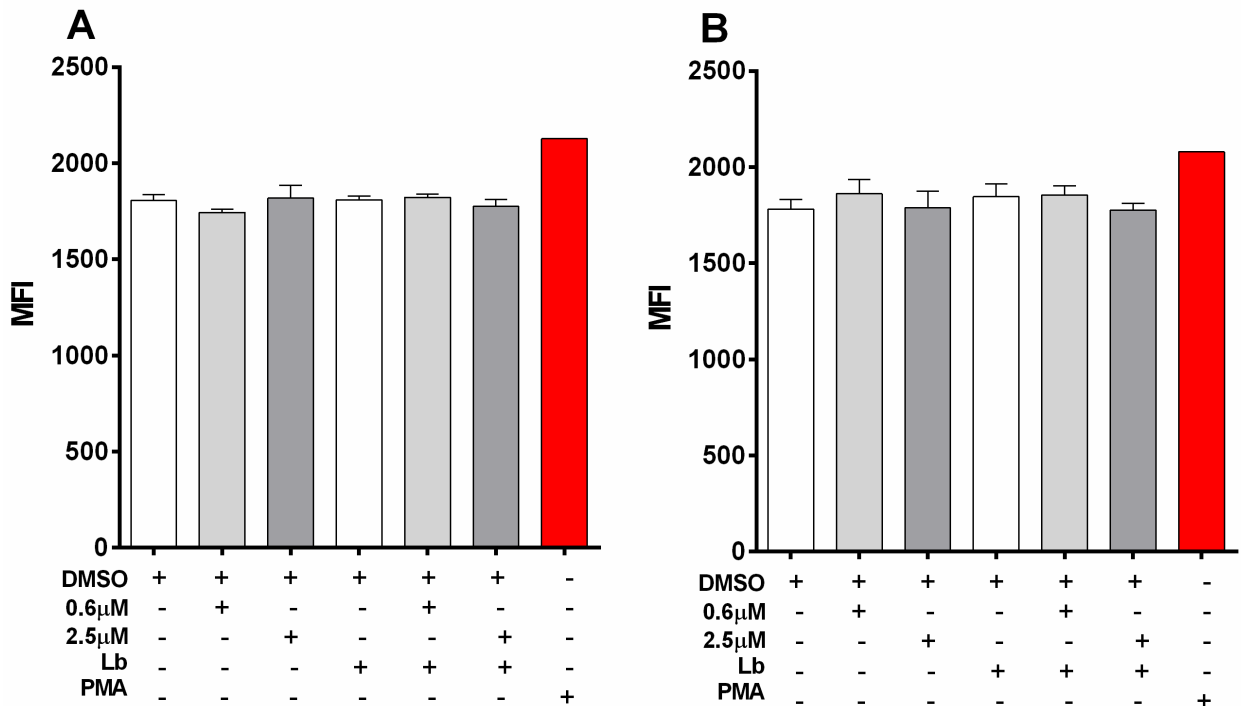
**Figura 9. Produção de citocinas por macrófagos infectados com *L. braziliensis* e tratados com KuRK259.** Macrófagos derivados de medula óssea não infectados e infectados com *L. braziliensis* foram tratados por 24h com KuRK259. A produção de IL-6 (A), CCL2/MCP-1 (B) e TNF (C) foi avaliada nos sobrenadante de cultura por CBA. LPS (100ng/mL) foi utilizado como controle positivo. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão e são relativos a um experimento, realizado em duplicata.

A produção de NO e ROS por macrófagos é um dos principais mecanismos de eliminação de leishmania por essas células (GANTT et al., 2001; LIEW et al., 1990a). Como anteriormente, os macrófagos foram infectados com *L. braziliensis*, tratados com KuRK259 em diferentes concentrações e o sobrenadante de cultura foi submetido à reação de Griess. Nas células não infectadas, a exposição ao KuRK259 não estimulou a produção de NO, em qualquer das duas concentrações testadas (Figura 10). De maneira similar, não observamos a indução da produção de NO nas células infectadas com *L. braziliensis* e tratadas com KuRK259 (Figura 10).



**Figura 10. Produção de óxido nítrico por macrófagos infectados por *L. braziliensis* e tratados com KuRK259.** Macrófagos derivados de medula óssea não infectados e infectados com *L. braziliensis* foram tratados com o KuRK259 por 24h na presença de 100ng de LPS. Em seguida os sobrenadantes foram avaliados quanto a produção de óxido nítrico pela reação de Griess. LPS foi utilizado como estímulo para a produção de NO. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão e são relativos a um experimento, realizado três vezes. \*,  $p < 0,05$ . \*\*,  $p < 0,01$ .

No que diz respeito a produção de ROS, também não observamos diferença nas células tratadas com o KuRK259 por 30 minutos ou por 2 horas (Figura 11A e B, respectivamente). Estes resultados indicam que o efeito leishmanicida de KuRK259 não possui relação com a produção de NO ou de ROS.



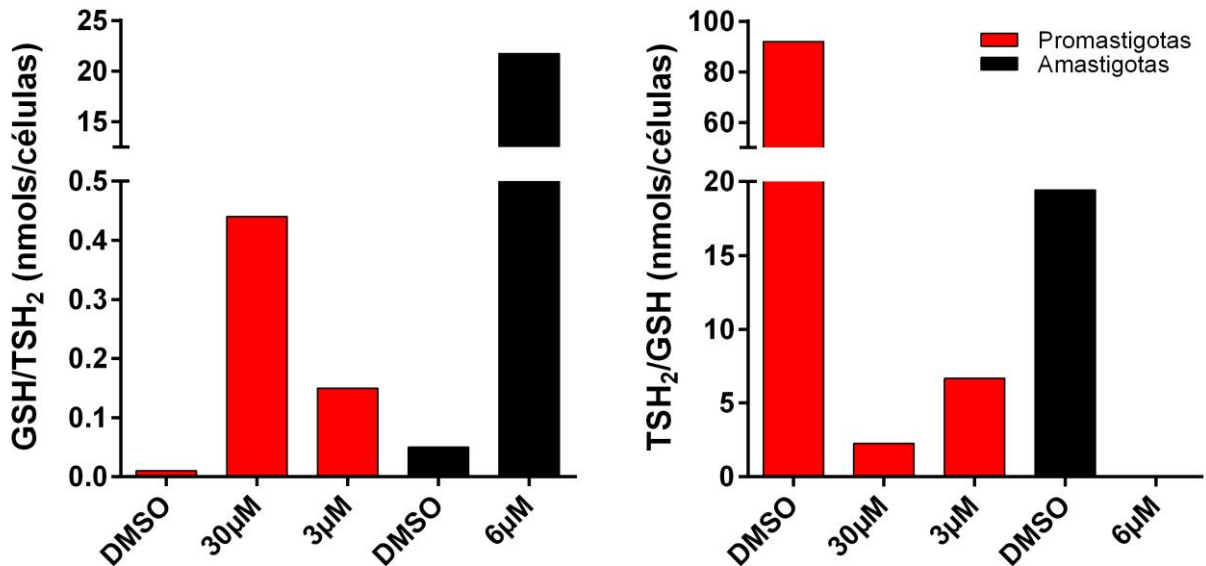
**Figura 11. Produção de ROS por macrófagos infectados por *L. braziliensis* e tratados com KuRK259.** Macrófagos derivados de medula óssea não infectados e infectados com *L. braziliensis* foram tratados com o KuRK259 por 30 minutos (A) e 2 horas (B). Em seguida as células foram marcadas com DHE e avaliadas quanto a produção de ROS por citometria de fluxo. PMA foi utilizado como estímulo para a produção de ROS. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão e são relativos a um experimento, realizado duas vezes.

## 5.6 EFEITO *ON TARGET* DO TRATAMENTO COM KURK259 EM PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS DE *L. BRAZILIENSIS*.

A capacidade de outros inibidores da TryS de interferir na produção de tripanotiona em *L. infantum* já foi demonstrada (BENÍTEZ et al., 2016; ZIMMERMANN et al., 2013). Com o objetivo de verificarmos se KuRK259 inibe diretamente a TryS de *L. braziliensis*, avaliamos os níveis de tióis (glutaciona e tripanotiona) nas formas promastigotas e amastigotas. Assim, formas promastigotas ou macrófagos J774 infectados com *L. braziliensis* foram tratados com diferentes concentrações do KuRK259 e em seguida a quantidade de tióis foi medida por HPLC. Após o tratamento com 30µM e com 3µM deste composto, observamos um aumento nos níveis de GSH (um dos substratos para a produção da tripanotiona) de cerca de 44 e 15 vezes, respectivamente, nas formas promastigotas. Nas formas amastigotas o tratamento com 6µM aumentou os níveis de GSH em torno de 434 vezes. Ao mesmo tempo, o



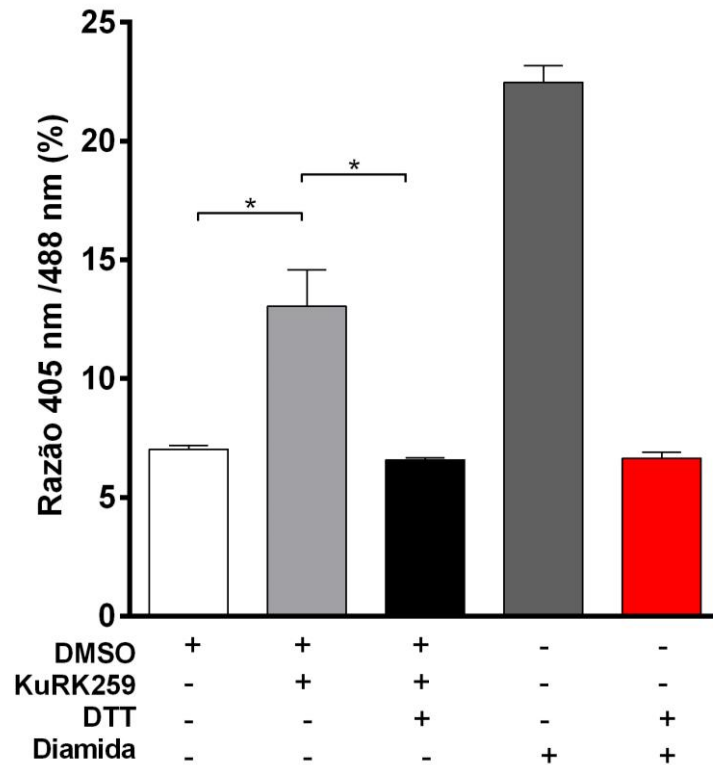
tratamento com KuRK259 reduziu os níveis de T(SH)<sub>2</sub> em torno de 40 e 15 vezes nas formas promastigotas e 380 vezes na forma amastigota, indicando que KuRK259 também inibe diretamente a TryS de *L. braziliensis* (Figura 12).



**Figura 12. Quantificação de tióis em promastigotas e amastigotas tratados com KuRK259.** Formas promastigotas de *L. braziliensis* ou macrófagos murinos (J774) infectados com *L. braziliensis* foram tratados com KuRK259 em diferentes concentrações por 24 horas. Tióis de baixo peso molecular foram derivatizados com monobromobimano separadamente e quantificados por HPLC. GSH, Glutathiona. T(SH)<sub>2</sub>, Tripanotiona. Os dados estão apresentados como valores absolutos e são relativos a um experimento.

Nós também utilizamos uma linhagem de *L. infantum* transgênica, repórter para alterações no metabolismo redox. Esta linhagem é capaz de detectar o status oxidativo intracelular de tióis de baixo peso molecular. Um aumento na razão 405/488 indica um status oxidativo, enquanto uma diminuição nessa razão indica um meio intracelular mais redutor. Assim, a *L. infantum* hGrx-roGFP foi incubada com 3,5 μM do KuRK259 por 24 horas e a emissão no comprimento de onda na faixa de 525/50nm e 530/50nm foi avaliada por citometria de fluxo (Figura 13). O tratamento com KuRK259 aumentou a razão 405/488nm, indicando um status oxidativo intracelular. Esse status foi revertido quando os parasitos tratados foram incubados com DTT (controle antioxidante) por 10 minutos. De maneira similar, quando os parasitos foram tratados com a diamida, um oxidante específico de tióis, foi observado um status oxidativo maior enquanto que a presença do DTT novamente reverteu esse status.

Esses resultados indicam que o KuRK259 interfere no metabolismo redox de promastigotas de *L. infantum*, corroborando os resultados obtidos com a quantificação de tióis (Figura 12).

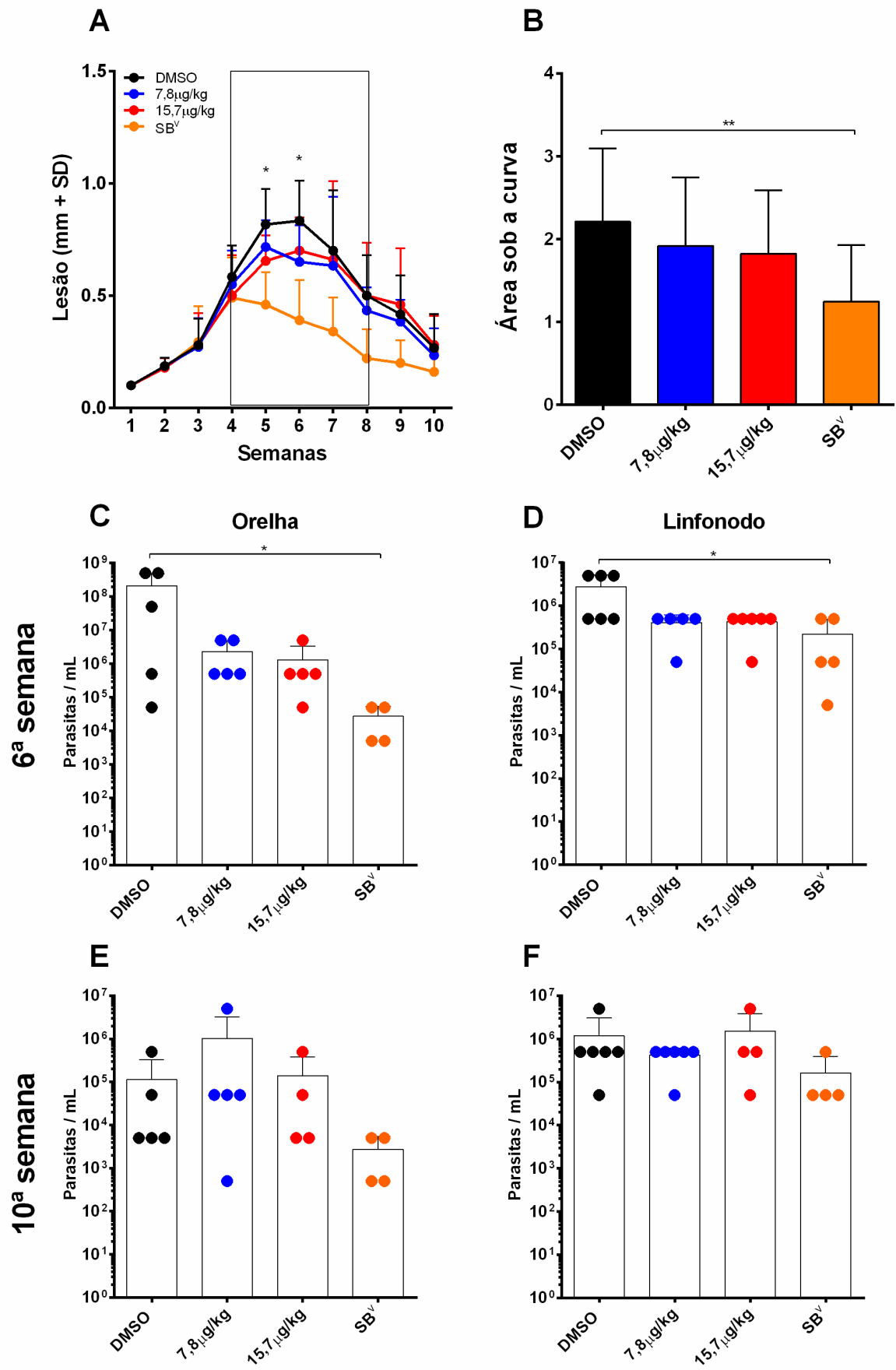


**Figura 13. Status oxidativo intracelular de promastigotas de *L. infantum* tratados com o KuRK259.** Promastigotas de *L. infantum* expressando uma proteína repórter hGrx-roGFP foi cultivada na presença de 3,5 $\mu$ M de KuRK259 por 24 horas e a emissão no comprimento de onda na faixa do 525/50nm e 530/50nm foi avaliada por citometria de fluxo. DTT (2mM) foi utilizado como antioxidante e diamida (250 $\mu$ M) como oxidante. DTT, Ditioneitol. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão e são relativos a um experimento, realizado em duplicata. \*,  $p < 0,05$ .

Nossos experimentos realizados *in vitro* mostraram que KuRK259 inibe o crescimento das formas promastigotas de *L. braziliensis*, diminui a quantidade de células infectadas e o número de amastigotas. O composto apresenta um  $EC_{50}$  na faixa do micromolar e um bom índice de seletividade. Estes efeitos foram observados na ausência de aumento na produção de citocinas ou NO e ROS. Além disso, o KuRK259 inibiu a atividade da TryS tanto nas formas promastigotas quanto amastigotas, evidenciando sua atuação direcionada ao metabolismo redox do parasita.

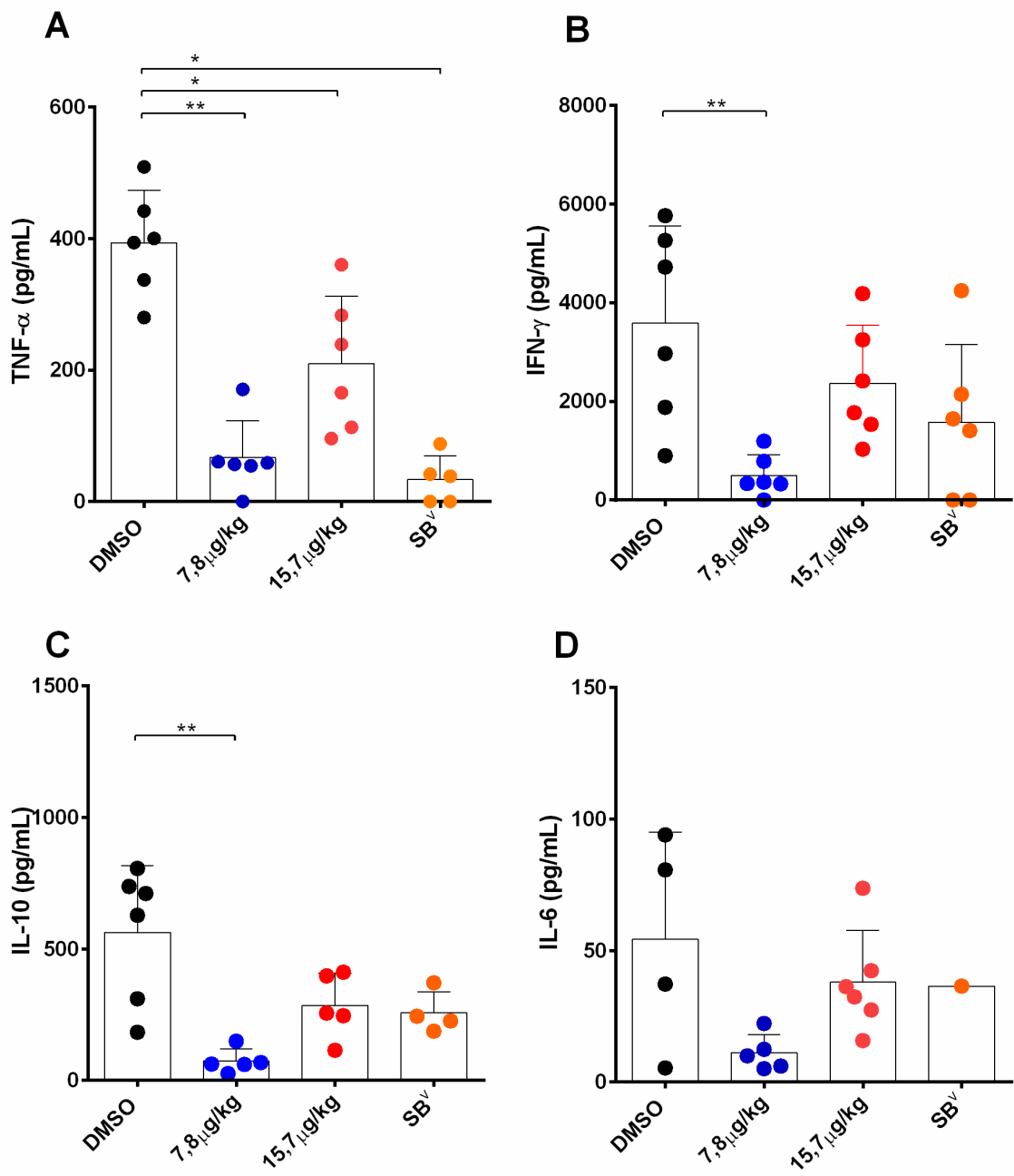
## 5.7 TRATAMENTO COM KURK259 EM UM MODELO PRÉ-CLÍNICO DE LEISHMANIOSE CUTÂNEA.

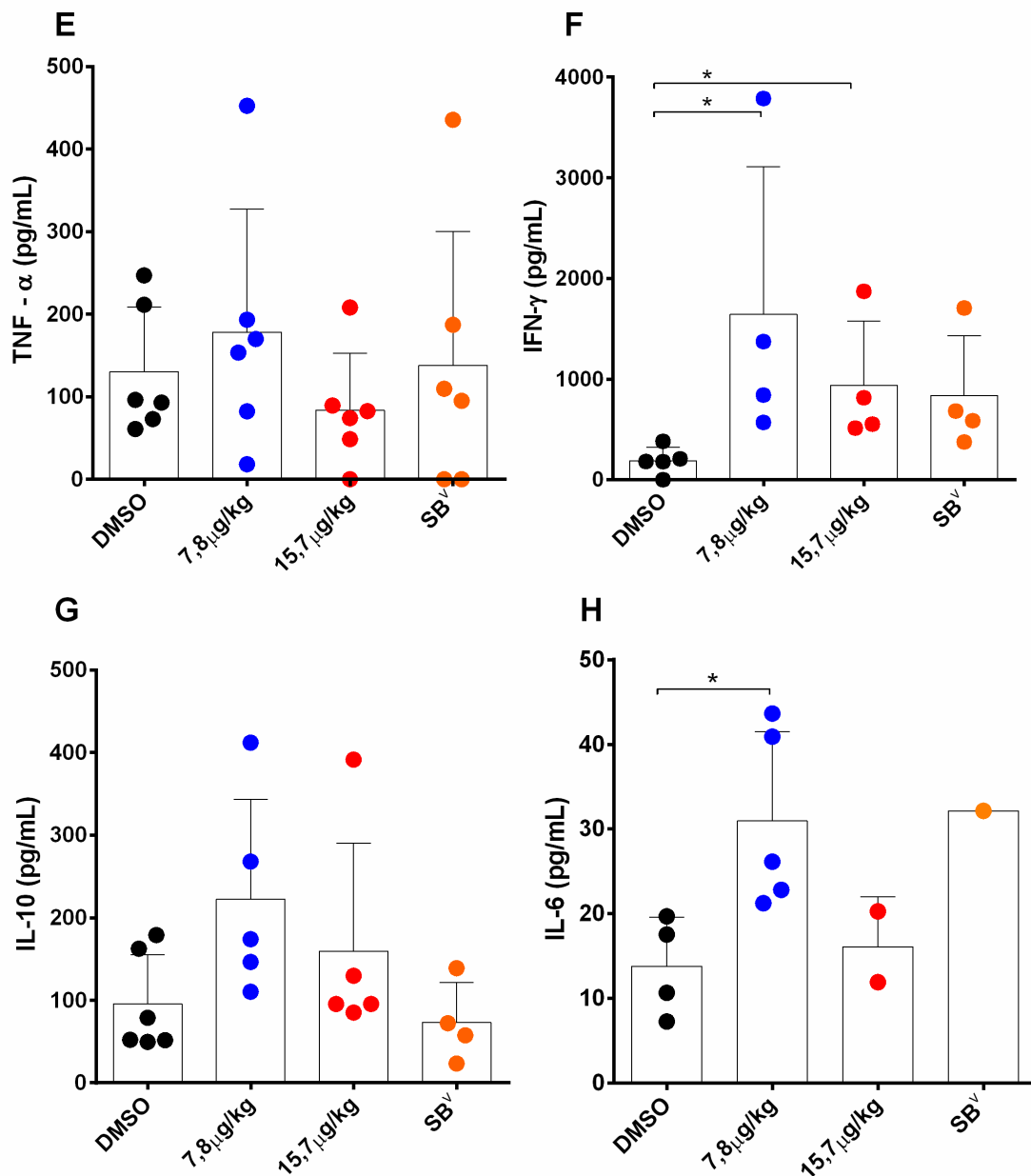
A partir dos ensaios *in vitro*, decidimos avaliar o efeito leishmanicida do KuRK259 *in vivo*, em modelo pré-clínico de LCL causado por *L. braziliensis* (DE MOURA et al., 2005). Camundongos foram infectados na derme da orelha e o tamanho da lesão foi acompanhado semanalmente durante 10 semanas. A partir da 3ª semana, os animais receberam tratamento intralesional com o KuRK259 nas doses de 7,8µg/kg e 15,7µg/kg ou receberam tratamento intraperitoneal com SB<sup>v</sup> (50mg/kg), três vezes por semana (Figura 14A). Na 5ª semana após a infecção, observamos uma diferença significativa no tamanho das lesões dos animais controle (tratados com DMSO) quando comparados aos animais tratados com 7,8µg/kg de KuRK259 ou com SB<sup>v</sup>. Já na 6ª semana, observamos uma diminuição significativa no tamanho das lesões dos animais tratados com 15,7µg/kg de KuRK259. Ao analisarmos a área sob a curva, no intervalo entre as semanas 4 a 8, observamos uma redução significativa somente no grupo de animais tratados com SB<sup>v</sup> (Figura 14B). Também não observamos diferenças na carga parasitária da orelha ou do linfonodo de drenagem nos animais tratados com o KuRK259 na 6ª semana (Figura 14C e D). Por fim, não observamos diferença na carga parasitária dos animais na 10ª semana após a infecção (Figura 14E e F).



**Figura 14. Desenvolvimento da LC em camundongos infectados e tratados com o KuRK259.** Camundongos foram infectados na derme da orelha com *L. braziliensis* e a partir da 3ª semana receberam tratamento intralesional do KuRK259, em diferentes concentrações ou SB<sup>v</sup> 50mg/kg. O grupo controle recebeu solução salina contendo DMSO 0.5%. O desenvolvimento da lesão foi avaliado através da espessura da orelha utilizando-se um paquímetro digital (A), Área sob a curva (B), Carga parasitária da orelha e do linfonodo na 6ª semana (C e D) e na 10ª semana (E e F). Número de animais por grupo = 6. Os dados estão apresentados como média ± desvio padrão e são relativos a um experimento. \*, p<0,05. \*\*, p<0,01

Também foi avaliada a produção de citocinas nos linfonodos. Camundongos infectados com *L. braziliensis* e tratados com KuRK259 ou com Glucantime foram eutanasiados na 6ª e 10ª semana, as células dos linfonodos de drenagem foram estimuladas com SLA e a produção de citocinas foi avaliada por CBA. Na 6ª semana a produção de TNF (Figura 15A), IFN- $\gamma$  (Figura 15B) e IL-10 (Figura 15C) foi menor nos animais tratados com KuRK259 em pelo menos uma das duas doses utilizadas, quando comparado com o controle DMSO. Em contrapartida, houve um aumento na produção de IFN- $\gamma$  na 10ª semana, nos animais tratados com o KuRK259 nas doses de 7,8 $\mu$ g/kg e 15,7 $\mu$ g/kg e um aumento de IL-6 somente nos animais tratados com 7,8 $\mu$ g/kg (Figura 15F e H). Não observamos diferença na produção de IL-6 na 6ª semana (Figura 15D) nem de TNF e IL-10 na 10ª semana (Figura 15E e G).

6<sup>a</sup> semana

10<sup>a</sup> semana

**Figura 15. Produção de citocinas em animais infectados com *L. braziliensis* e tratados com KuRK259.** Camundongos foram infectados na derme da orelha com *L. braziliensis* e a partir da 3<sup>a</sup> semana receberam tratamento intralesional do KuRK259 em diferentes concentrações ou SB<sup>v</sup> 50mg/kg. Os linfonodos drenantes foram coletados na 6<sup>a</sup> e 10<sup>a</sup> semana e reestimulados *in vitro*. A produção de TNF, IFN- $\gamma$ , IL-10 e IL-6 foi avaliada nos sobrenadante de cultura por CBA após 48 horas. Os dados estão apresentados como média  $\pm$  desvio padrão e são relativos a um experimento. \*,  $p < 0,05$ . \*\*,  $p < 0,01$ .

## 6. DISCUSSÃO

As atuais medicamentos utilizados para o tratamento da leishmaniose possuem desvantagens como alta toxicidade, forma de administração, longo tempo de tratamento, alto custo assim como o surgimento resistência (revisado por SUNDAR, Shyam; CHAKRAVARTY, 2015). Sendo assim, a descoberta de novos fármacos continua sendo necessária e, preferencialmente, estes novos compostos devem atender ainda às seguintes necessidades: baixa toxicidade, fácil forma de administração, tempo curto de tratamento e baixo custo (PACE, 2014). Neste sentido, o metabolismo redox de tripanossomatídeos tem se mostrado um alvo interessante para o desenvolvimento de medicamentos antiparasitários, pois inclui moléculas vitais, as quais estão presentes somente no parasito e não no hospedeiro, ou, quando presentes, apresentam diferenças marcantes o suficientes para serem alvos seletivos (revisado por FLOHÉ, 2012).

Os Paullones são um grupo de moléculas baseados na estrutura 7,12-dihidroindolo[3,2-d][1]benzazepina-6(5H) com atividade inibitória sobre a proteína cinase de mamíferos (revisado por TOLLE; KUNICK, 2011). Diversos trabalhos vem mostrando a atividade dessa classe de moléculas contra tripanossomatídeos induzindo efeitos microbicidas (MAIWALD et al., 2014; RYCZAK et al., 2013; SOUSA et al., 2014). Em um estudo prévio, foi demonstrada a capacidade de moléculas derivadas de Paullones de inibir a atividade de TryS recombinante de *L. infantum* (Medeiros et al., manuscrito em preparação). Dos 16 compostos testados, cinco reduziram a porcentagem de macrófagos infectados por *L. braziliensis* em torno de 50%. Diante desses achados, avaliamos o efeito leishmanicida de um dos 5 compostos, o KurK259, sobre a infecção por *L. braziliensis*. Vale ressaltar que a maioria dos casos de leishmaniose está associada à forma tegumentar da doença, com 1,5 milhão de pessoas afetadas em todo o mundo, sendo que, a *L. braziliensis* é o principal agente causador da leishmaniose no Brasil, com 25.763 novos casos por ano (BRASIL, 2017). Além disso, uma forma mais grave da doença, a leishmaniose mucocutânea, está fortemente associada a essa espécie de parasito nas américas (ARONSON et al., 2016).

O KurK259 é um tipo de Paullone com uma substituição no átomo de nitrogênio na posição 5, que lhe confere baixa afinidade com as proteínas cinase de mamíferos



(KUNICK et al., 2004). Dos compostos testados em nosso estudo, o KuRK259 se mostrou o mais potente quando utilizando na concentração de 10 $\mu$ M em macrófagos J774 infectados com *L. braziliensis*. A partir de ensaios *in vitro* nós determinamos um EC<sub>50</sub> de 10 $\mu$ M para as formas promastigotas e 1,19 $\mu$ M para as formas amastigotas assim como um índice de seletividade de 20.

Comparando esses resultados com a literatura, referente a inibidores de TryS de *Leishmania*, um trabalho encontrou 4 diferentes moléculas com valores de EC<sub>50</sub> variando entre 11,23 $\mu$ M e 18,02 $\mu$ M para promastigotas de *L. donovani* (SAUDAGAR; DUBEY, 2011). Os mesmos autores encontraram um outro inibidor da TryS, o PS-203, o qual apresentou um EC<sub>50</sub> de 4,9 $\mu$ M também para mesma espécie do parasito (SAUDAGAR et al., 2013). Sousa e colaboradores (2014) selecionaram um Paullone de uma biblioteca de Paullones (N<sup>5</sup> substituídos), que apresentou um EC<sub>50</sub> de 112,3 $\mu$ M para promastigotas de *L. infantum*. Benítez e colaboradores (2016) em um estudo de *screening* similar ao nosso, identificou um Paullone com um EC<sub>50</sub> de 12,6 $\mu$ M para promastigotas *L. infantum*. Assim, o valor de EC<sub>50</sub> que encontramos no presente estudo para *L. braziliensis*, obtido com o KuRK259, é semelhante aos relatados acima para as formas promastigotas. Entretanto, nestes estudos da literatura não foi determinado o valor de EC<sub>50</sub> para as formas amastigotas, dificultando as comparações nesse estágio do ciclo de vida. Assim, um EC<sub>50</sub> calculado em 1,19 $\mu$ M (0,6 $\mu$ g/mL) *in vitro* e um índice de seletividade de 20 é interessante para o rastreamento de drogas antiparasitárias, visto que o critério colocado pela literatura é de um EC<sub>50</sub> com valor máximo de 1 $\mu$ g/mL e índice de seletividade 10 vezes maior que o EC<sub>50</sub> (PINK et al., 2005).

A respeito das diferenças entre efeito leishmanicida da droga e o estágio e vida, nós acreditamos que a atividade da TryS seja muito mais importante para o parasito na sua forma amastigota. Nesse estágio do ciclo de vida da *Leishmania*, quando o parasito reside dentro do macrófago, o mesmo é ativado pela presença de TNF e IFN- $\gamma$ , produzindo NO (BOGDAN et al., 1990; GREEN et al., 1990; LIEW et al., 1990b; LIEW; LI; MILLOTT, 1990) e ROS (CHANNON; ROBERTS; BLACKWELL, 1984) dentro do vacúolo parasitóforo o que leva à destruição do parasito. Sendo assim, mecanismos de defesa contra dano celular causados por ROS e NO são importantes para a sua sobrevivência. De fato, alguns autores sugerem que a tripanotona, produto da TryS, é um destes mecanismos, pois a mesma exerce seu efeito antioxidante

diretamente, se ligando a ROS e NO ou indiretamente, através de enzimas do metabolismo redox como peroxiredoxinas, um tipo de peroxidase (BOCEDI et al., 2010b; MUKHERJEE et al., 2009; THOMSON; DENICOLA; RADI, 2003). Sendo assim, acreditamos que o tratamento dos macrófagos infectados com o KuRK259 inibe a TryS nas formas amastigotas, reduzindo a produção de tripanotiona. Com uma menor quantidade de tripanotiona, a capacidade de defesa contra ROS e NO, é comprometida, explicando o efeito leishmanicida maior do KuRK259 nesse estágio do ciclo de vida da leishmania. Provavelmente, inibindo a produção de ROS e NO utilizando macrófagos de camundongos deficientes na produção destes mediadores, observaríamos uma maior taxa de infecção e maior quantidade de amastigotas nas células. Neste cenário, o tratamento dessas células com o KuRK259 teria um efeito menor na diminuição da infecção, produzindo maiores valores de EC<sub>50</sub> para a droga, confirmando assim a importância de ROS e NO para a ação do KuRK259.

Seguindo na investigação dos efeitos de KuRK259 sobre *L. braziliensis*, nós avaliamos as alterações estruturais após o tratamento de células infectadas. O tratamento destas com KuRK259 induziu dilatação mitocondrial, vacuolização e a perda de individualização das organelas citoplasmáticas na leishmania. Esses sinais que não foram observados nos macrófagos indicando sofrimento e morte celular somente dos parasitos. Khouri e colaboradores (2010) reportaram que *L. braziliensis* tratados com DETC, um inibidor de SOD1, também apresentaram mudanças estruturais em promastigotas e amastigotas. Uma das alterações observadas nas formas amastigotas foi a intensa vacuolização do citoplasma e dilatação mitocondrial nas formas promastigotas. Tais alterações parecem estar associadas a estresse oxidativo causado pelo macrófago após exposição ao DETC, o qual inibe a SOD1 e induz acúmulo de superóxido. Outro trabalho mostrou que formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com um inibidor da calpaína, o MDL28170, também apresentaram intensa vacuolização do citoplasma (MARINHO et al., 2014). Recentemente foi mostrado que promastigotas de *L. braziliensis* tratadas com diferentes formulações de própolis também mostraram perda da individualização das organelas citoplasmáticas (REBOUÇAS-SILVA et al., 2017). Assim, o estresse oxidativo no vacúolo parasitóforo como consequência da inibição da TryS, pode explicar as alterações estruturais observadas.

Está bem descrito que o controle da infecção por *Leishmania* em camundongos está associado a produção de citocinas pró inflamatórias como TNF, IFN- $\gamma$ , IL-1 e IL-12 (PARK et al., 2002; PINHEIRO; ROSSI-BERGMANN, 2007; THEODOS et al., 1991; VON STEBUT et al., 2003; WILHELM et al., 2001a). Citocinas como IFN- $\gamma$  e TNF induzem a produção de moléculas microbidas, como ROS e NO, capazes de eliminar o parasito dentro dos macrófagos (BOGDAN et al., 1990; GREEN et al., 1990). Em contrapartida a produção de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-10, IL-13 e TGF- $\beta$  está associada a susceptibilidade a infecção com replicação e persistência do parasito (BELKAID et al., 2001; GORELIK; CONSTANT; FLAVELL, 2002; KOPF, 1996; MATTHEWS et al., 2000; SOSA et al., 2001).

O TNF é produzido principalmente por macrófagos e diversos trabalhos relataram que essa citocina tem um papel importante na eliminação da *Leishmania* por meio da indução da produção de NO (LIEW; WEI; PROUDFOOT, 1997). Foi demonstrado que animais deficientes em TNF e infectados com *L. major* desenvolvem lesões maiores, produzem menos NO e evoluem para uma forma visceral e fatal da doença, quando comparados aos animais controle (WILHELM et al., 2001b). Em outro trabalho, o tratamento de macrófagos infectados com TNF recombinante diminuiu a quantidade de amastigotas dentro das células, enquanto animais imunizados e infectados com *L. major*, quando tratados com um anticorpo anti-TNF desenvolveram lesões maiores do que animais controle (THEODOS et al., 1991). O papel do TNF também foi avaliado em testes com *L. braziliensis*. Camundongos C57BL/6 deficientes na produção de TNF infectados com *L. braziliensis* apresentaram maiores lesões que não curaram e maior carga parasitária que os animais controle demonstrando a importância do TNF para controlar a infecção causada essa espécie de parasito (ROCHA et al., 2007). A IL-6 pode atuar tanto como uma citocina pro-inflamatória ou como anti-inflamatória (SCHELLER et al., 2011). Entretanto, no cenário da leishmaniose essa citocina está associada a susceptibilidade para a LCL visto que animais deficientes para IL-6 infectados com *L. major* se mostraram resistentes, com menor tamanho da lesão, menor número de parasitas (MOSKOWITZ; BROWN; REINER, 1997).

O CCL2/MCP1 é uma quimiocina importante para o recrutamento de uma subpopulação de monócitos que elimina *L. major* eficientemente, conferindo resistência aos animais (GONCALVES et al., 2011). Outro trabalho investigou o papel

do CCR2, o único receptor conhecido pra CCL2/MCP1, na infecção por *L. braziliensis*. Foi observado que camundongos nocaute para o CCR2 tiveram menor capacidade de controlar a doença devido a uma menor diferenciação de células dendríticas com perfil inflamatório, produtoras de TNF e expressando iNOS no local da infecção (COSTA et al., 2016).

O NO é produzido por macrófagos ativados por IFN- $\gamma$ , controlando a replicação ou eliminando esses patógenos. O NO atua reagindo com elementos estruturais da célula, componentes da maquinaria de replicação, ácidos nucleicos, enzimas metabólicas ou com moléculas associadas a virulência de patógenos (BOGDAN; RÖLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000; FANG, 2004). Diversos estudos tem demonstrado a importância do NO na leishmaniose causada por *L. major* utilizando inibidores específicos e inespecíficos de NOS2 ou animais deficientes para essa enzima mostrando que na ausência de NO o controle da infecção fica comprometido (LIEW et al., 1990; EVANS et al., 1993; WEI et al., 1995; BOGDAN; RÖLLINGHOFF; DIEFENBACH, 2000b;). Macrófagos humanos infectados com *L. braziliensis* ou com *L. amazonensis*, resistentes a NO, apesar de apresentarem a mesma porcentagem de infecção dos controles, após 96 horas apresentaram maior porcentagem de macrófagos infectados e amastigotas evidenciando que NO é importante para o controle da replicação *in vitro* (GIUDICE et al., 2007). NO desempenha um papel importante no controle da infecção no modelo murino, entretanto, em humanos seu papel ainda é discutido. Novais e colaboradores (2014) mostraram que monócitos humanos clássicos ativados com IFN- $\gamma$  controlam a infecção por *L. braziliensis* através da produção do ROS, visto que o inibidor da NADPH oxidase aumentou as taxas de infecção e amastigotas, mas não o inibidor da NOS2. De maneira semelhante, foi mostrado que monócitos de pacientes com LCL tratados com inibidores da NADPH oxidase e NOS2 e infectados com *L. braziliensis*, além de mostrarem uma maior explosão respiratória, dependem da produção ROS mas não de NO para controlar a infecção *in vitro* (CARNEIRO et al., 2016).

Em nosso trabalho não encontramos diferença na produção das citocinas TNF- $\alpha$  e IL-6 e da quimiocina CCL2/MCP1 quando comparados ao controle, assim como não observamos uma maior produção de NO e ROS no tratamento de células infectadas e tratadas com KuRK259. Esses resultados indicam que a diminuição da infecção nos macrófagos após o tratamento com o KuRK259 não está associada a

uma maior produção dessas moléculas *in vitro*. Como dito anteriormente, acreditamos que o tratamento com o KuRK259 age diretamente sobre as formas amastigotas de *L. braziliensis* reduzindo a capacidade destes de evadir da ação de ROS e NO.

Neste trabalho avaliamos a capacidade do KuRK259 em inibir a atividade da TryS medindo os níveis da GSH e da T(SH)<sub>2</sub>, seu substrato e produto. Empregando um ensaio enzimático, foi demonstrado que o KuRK259 inibe a atividade de TryS, sob a forma recombinante, de *L. infantum* com um IC<sub>50</sub> de 0.3µM (Medeiros et al., manuscrito em preparação), mostrando então a sua capacidade de interferir na síntese da tripanotona. Em nossos experimentos, utilizando formas promastigotas e amastigotas de *L. braziliensis*, confirmamos a capacidade do fármaco em interferir nos níveis de tripanotona e glutatona no interior dos parasitos, validando a TryS quimicamente como alvo para drogas. Outros trabalhos já demonstraram que a TryS pode ser inibida a nível celular. Torrie e colaboradores (2009) demonstraram que *T. brucei* tratado com DDD86243, um inibidor de TryS, apresentaram quantidades reduzidas de T(SH)<sub>2</sub> de maneira dose dependente e um aumento nas quantidades de GSH. Nesse mesmo trabalho, o mesmo inibidor foi testado contra parasitos deficientes em TryS, apresentando EC<sub>50</sub> menor, enquanto que empregando parasitos que superexpressam a TryS, o EC<sub>50</sub> encontrado foi maior quando comparado ao controle selvagem. Outro trabalho mostrou que promastigotas de *L. infantum* tratados com MOL2008, um Paullone inibidor da TryS, apresentaram quantidades reduzidas de T(SH)<sub>2</sub> e GSH (BENÍTEZ et al., 2016). Em *L. donovani*, o inibidor PS-203, o qual age na TryS e na TR diminuiu a quantidade de T(SH)<sub>2</sub> e aumentou a quantidade de GSH em promastigotas tratados (SAUDAGAR et al., 2013). De maneira diferente, Sousa e colaboradores (2014) mostraram o efeito do Paullone FS-554 tratando promastigotas que expressavam diferentes quantidades da TryS. Os autores observaram que a potência do inibidor variou de maneira inversa com a expressão da TryS nos parasitos, validando quimicamente a enzima. Aqui, nós confirmamos a capacidade do KuRK259 em inibir a TryS em *L. braziliensis*.

Por fim, o potencial terapêutico do KuRK259 foi avaliado *in vivo*, utilizando-se um modelo pré-clínico para LCL (DE MOURA et al., 2005). Esse modelo de LCL tem sido explorado em diversos outros trabalhos que estudam novas drogas para o tratamento da leishmaniose. Santos e colaboradores (2014) demonstraram que camundongos infectados com *L. braziliensis* e tratados com um inibidor da HSP90, o

17-AAG, apresentaram lesões menores e menor quantidade de parasitos na orelha quando comparado ao controle, mas não nos linfonodos drenantes. Outro trabalho, utilizando o mesmo modelo demonstrou que DETC, um inibidor da SOD1, diminuiu o tamanho das lesões e a carga parasitária na orelha de animais tanto tratados sistemicamente (KHOURI et al., 2010) como localmente (CELES et al., 2016). Em nosso estudo, a aplicação intralesional de KuRK259 reduziu o tamanho das lesões na 5ª e 6ª semana após a infecção, entretanto o tratamento não foi capaz de reduzir de maneira significativa a quantidade de parasitos na orelha e linfonodo drenante. A literatura tem relatado o uso de SB<sup>v</sup> intralesional como via de tratamento para pacientes com LCL e a Organização Mundial da Saúde (WHO ou OMS) juntamente com a Organização Pan-americana para a Saúde (OPAS) incluiu essa via entre as formas alternativas para o tratamento da leishmaniose (PHAO; WHO, 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2010). Essa forma de tratamento apresenta vantagens, como a diminuição de efeitos adversos do medicamento, uso de menor quantidade de SB<sub>v</sub> e regime de tratamento com menor número de aplicações. Além disso, os trabalhos publicados têm relatado uma eficiência igual ou superior dessa forma de tratamento quando comparado com a aplicação sistêmica de SB<sup>v</sup>. (ARBOLEDA et al., 2019; DE OLIVEIRA DUQUE et al., 2019; MADEIRA et al., 2012; PAREDES et al., 2017; SILVA et al., 2016, 2018).

Neste trabalho, a via intralesional foi escolhida para aplicação do KuRK259, levando em consideração a quantidade de droga utilizada, os possíveis efeitos adversos da droga bem como o do seu veículo DMSO e a baixa solubilidade da molécula em água. Entretanto, não observamos diminuição na carga parasitária dos animais tratados por esta via, seja no sítio de infecção ou no linfonodo de drenagem. Fatores como a quantidade de composto utilizado *in vivo*, a forma de aplicação e o esquema de tratamento podem ter influenciado nesse desfecho. É possível que, para o tratamento *in vivo*, seja necessária uma maior concentração de KuRK259 pois o tecido em si pode afetar a biodisponibilidade da droga, impedindo sua absorção pelas células alvo que são os macrófagos infectados. Além disso, outros elementos podem interagir com o KuRK259, biotransformando a droga no tecido e inativando-a. Outra possibilidade é que a droga injetada na derme da orelha seja drenada pelos vasos, fazendo com que a dose ideal para se obter o efeito na orelha não seja alcançada.

O controle da infecção por *Leishmania* está associado a produção de TNF e IFN- $\gamma$  por linfócitos T específicos para o parasito (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). Entretanto a produção exacerbada dessas citocinas pode causar dano tecidual e produzir maiores lesões em humanos (NICODEMO et al., 2012). *In vivo*, os animais tratados com KuRK259 apresentaram níveis mais baixos das citocinas TNF, IFN- $\gamma$  e IL-10 na 6ª semana, quando comparados com os animais controle. A produção menor de citocinas pode estar associada ao tamanho menor das lesões nesse mesmo período, resultado de um ambiente menos inflamado. De fato, alguns trabalhos tem demonstrado que níveis excessivos de TNF, IFN- $\gamma$  estão relacionados com maior tamanho de lesões em humanos (ANTONELLI et al., 2005; D'OLIVEIRA JUNIOR et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2011). Por outro lado, a aplicação do KuRK259 não reduziu a carga parasitária na 6ª semana, em nenhuma das duas concentrações testadas. Esse resultado pode estar relacionado com a menor produção de TNF e IFN- $\gamma$  visto que essas citocinas são importantes na ativação dos macrófagos e eliminação da leishmania (BARRAL et al., 1995; DEKREY; LIMA; TITUS, 1998; ROCHA et al., 2007). Na 10ª semana, apesar das lesões apresentarem o mesmo tamanho, observamos maior produção de IFN- $\gamma$  e IL-6 nos grupos tratados com 7,8 $\mu$ g/kg do KuRK259. Entretanto a carga parasitária se manteve semelhante ao controle DMSO.

## 7. CONCLUSÃO

Nosso trabalho mostrou que KuRK259 inibe o crescimento de formas promastigotas e provoca a morte celular de formas amastigotas de *L. braziliensis*, por meio da inibição da atividade da TryS. *In vivo*, a droga reduziu o tamanho das lesões de camundongos infectados, mas não diminuiu a carga parasitária. Sendo assim, moléculas capazes de inibir a atividade da TryS e, conseqüentemente, a produção de T(SH)<sub>2</sub> possuem um potencial para o desenvolvimento de drogas para o tratamento da LC. No entanto, são necessários experimentos adicionais para avaliar a melhor concentração da droga assim como outras formas de administração para determinar a eficácia do KuRK259.



## REFERÊNCIAS

ADAUI, V. *et al.* Comparison of gene expression patterns among *Leishmania braziliensis* clinical isolates showing a different in vitro susceptibility to pentavalent antimony. **Parasitology**, v. 138, n. 2, p. 183–193, 2011.

AMATO, V. *et al.* Treatment of mucocutaneous leishmaniasis with pentamidine isothionate. **Annales de dermatologie et de venerologie**, v. 125, n. 8, p. 492–5, ago. 1998.

ANTONELLI, L. R. V. *et al.* Activated inflammatory T cells correlate with lesion size in human cutaneous leishmaniasis. **Immunology Letters**, v. 101, n. 2, p. 226–230, nov. 2005.

ARBOLEDA, M. *et al.* Successful treatment of cutaneous leishmaniasis with intralesional meglumine antimoniate: A case series. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 52, 2019.

AREVALO, J. *et al.* Influence of *Leishmania (Viannia)* Species on the Response to Antimonial Treatment in Patients with American Tegumentary Leishmaniasis. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 195, n. 12, p. 1846–1851, 2007.

ARIYANAYAGAM, M. R. *et al.* Phenotypic analysis of trypanothione synthetase knockdown in the African trypanosome. **The Biochemical journal**, v. 391, n. Pt 2, p. 425–432, 2005.

ARONSON, N. *et al.* Diagnosis and Treatment of Leishmaniasis: Clinical Practice Guidelines by the Infectious Diseases Society of America (IDSA) and the American Society of Tropical Medicine and Hygiene (ASTMH). **Clinical Infectious Diseases**, v. 63, n. 12, p. e202–e264, 15 dez. 2016.

BARRAL, A. *et al.* Transforming growth factor-beta in human cutaneous leishmaniasis. **The American journal of pathology**, v. 147, n. 4, p. 947–54, 1995.

BECKER, I. *et al.* The efficacy of pentamidine combined with allopurinol and immunotherapy for the treatment of patients with diffuse cutaneous leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 85, n. 3, p. 165–170, 11 jan. 1999.

BELKAID, Y. *et al.* The Role of Interleukin (IL)-10 in the Persistence of *Leishmania major* in the Skin after Healing and the Therapeutic Potential of Anti-IL-10 Receptor Antibody for Sterile Cure. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 194, n. 10, p. 1497–1506, 19 nov. 2001.

BENÍTEZ, D. *et al.* Identification of Novel Chemical Scaffolds Inhibiting Trypanothione Synthetase from Pathogenic Trypanosomatids. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. 1–25, 2016.

BOCEDI, A. *et al.* Trypanothione efficiently intercepts nitric oxide as a harmless iron complex in trypanosomatid parasites. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 24, n. 4, p. 1035–1042, 2010a.

BOCEDI, A. *et al.* Trypanothione efficiently intercepts nitric oxide as a harmless iron complex in trypanosomatid parasites. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 4, p. 1035–1042, abr. 2010b.

BOGDAN, C. *et al.* Tumor necrosis factor-alpha in combination with interferon-gamma, but not with interleukin 4 activates murine macrophages for elimination of *Leishmania major* amastigotes. **European journal of immunology**, v. 20, n. 5, p. 1131–5, maio 1990.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. The role of nitric oxide in innate immunity. **Immunological reviews**, v. 173, n. 1, p. 17–26, fev. 2000.

BRAJTBURG, J. *et al.* Amphotericin B: current understanding of mechanisms of action. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 34, n. 2, p. 183–8, fev. 1990.

BRASIL. **Manual De Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar**. [s.l: s.n.].

BRITO, G. *et al.* Clinical and immunological outcome in cutaneous leishmaniasis patients treated with pentoxifylline. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 90, n. 4, p. 617–620, 2014.

BRITO, G. *et al.* Oral pentoxifylline associated with pentavalent antimony: A randomized trial for cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 5, p. 1155–1159, 2017.

CARNEIRO, P. P. *et al.* The role of nitric oxide and reactive oxygen species in the killing of *Leishmania braziliensis* by monocytes from patients with cutaneous leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 11, n. 2, p. 1–16, 2016.

CARVALHO, L.; ARAÚJO, M. I. A. S.; CARVALHO, E. M. Immune response mechanisms to infections. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 647–664, 2004.

CARVALHO, S. H. *et al.* American tegumentary leishmaniasis in Brazil: a critical review of the current therapeutic approach with systemic meglumine antimoniate and short-term possibilities for an alternative treatment. **Tropical Medicine & International Health**, v. 24, n. 4, p. 380–391, 19 abr. 2019.

CELES, F. S. *et al.* DETC-based bacterial cellulose bio-curatives for topical treatment of cutaneous leishmaniasis. **Scientific Reports**, v. 6, n. iii, p. 1–11, 2016.

CHANNON, J. Y.; ROBERTS, M. B.; BLACKWELL, J. M. A study of the differential respiratory burst activity elicited by promastigotes and amastigotes of *Leishmania donovani* in murine resident peritoneal macrophages. **Immunology**, v. 53, n. 2, p. 345–55, out. 1984.

CHARLTON, R. L. *et al.* Repurposing as a strategy for the discovery of new anti-leishmanials: The-state-of-the-art. **Parasitology**, v. 145, n. 2, p. 219–236, 2018.

COLOTTI, G. *et al.* Structural insights into the enzymes of the trypanothione pathway : targets for antileishmaniasis drugs . PubMed Commons. p. 24144416, 2014.

COMINI, M. A. *et al.* Validation of *Trypanosoma brucei* trypanothione synthetase as drug target. **Free Radical Biology & Medicine**, v. 36, n. 10, p. 1289–302, 15 maio 2004.

COMINI, M. A.; FLOHÉ, L. Trypanothione-Based Redox Metabolism of Trypanosomatids. In: **Trypanosomatid Diseases**. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, 2013. p. 167–199.

COSTA, D. L. *et al.* CCR2 signaling contributes to the differentiation of protective inflammatory dendritic cells in *Leishmania braziliensis* infection. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 100, n. 2, p. 423–432, 2016.

CROFT, S. L. *et al.* The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. **Biochemical pharmacology**, v. 36, n. 16, p. 2633–6, 15 ago. 1987.

CROFT, S. L.; SEIFERT, K.; DUCHÊNE, M. Antiprotozoal activities of phospholipid analogues. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 126, n. 2, p. 165–72, fev. 2003.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 111–26, jan. 2006.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by leishmania. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 72, n. 2, p. 132–141, 2002.

D'OLIVEIRA JUNIOR, A. *et al.* Evaluation of IFN-gamma and TNF-alpha as immunological markers of clinical outcome in cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 35, n. 1, p. 7–10, fev. 2002.

DE MOURA, T. R. *et al.* Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Infection and Immunity**, v. 73, n. 9, p. 5827–34, set. 2005.

DE OLIVEIRA DUQUE, M. C. *et al.* Comparison between systemic and intralesional meglumine antimoniate therapy in a primary health care unit. **Acta Tropica**, v. 193, p. 176–182, maio 2019.

DEKREY, G. K.; LIMA, H. C.; TITUS, R. G. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 2, p. 827–9, fev. 1998.

DORLO, T. P. C. *et al.* Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. **The Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 67, n. 11, p. 2576–97, nov. 2012.

DUMAS, C. *et al.* Disruption of the trypanothione reductase gene of *Leishmania* decreases its ability to survive oxidative stress in macrophages. **The EMBO journal**, v. 16, n. 10, p. 2590–8, 15 maio 1997.

DUQUE, M. C. DE O. *et al.* Standardization of intralesional meglumine antimoniate treatment for cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 6, p. 774–776, dez. 2016.

ESPADA, C. R. *et al.* Investigation of the pathways related to intrinsic miltefosine tolerance in *Leishmania (Viannia) braziliensis* clinical isolates reveals differences in drug uptake. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, fev. 2019.

EVANS, T. G. *et al.* Effect of in vivo inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. **Journal of Immunology**, v. 151, n. 2, p. 907–15, 15 jul. 1993.

FANG, F. C. Antimicrobial reactive oxygen and nitrogen species: Concepts and controversies. **Nature Reviews Microbiology**, v. 2, n. 10, p. 820–832, 2004.

FLOHÉ, L. The trypanothione system and the opportunities it offers to create drugs for the neglected kinetoplast diseases. **Biotechnology Advances**, v. 30, n. 1, p. 294–301, 2012.

GANTT, K. R. *et al.* Oxidative Responses of Human and Murine Macrophages During Phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **The Journal of Immunology**, v. 167, n. 2, p. 893–901, 2001.

GIUDICE, A. *et al.* Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis. **BMC Infectious Diseases**, v. 7, p. 1–12, 2007.

GONCALVES, R. *et al.* Platelet activation attracts a subpopulation of effector monocytes to sites of *Leishmania major* infection. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 208, n. 6, p. 1253–1265, 2011.

GORELIK, L.; CONSTANT, S.; FLAVELL, R. A. Mechanism of transforming growth factor beta-induced inhibition of T helper type 1 differentiation. **The Journal of Experimental Medicine**, v. 195, n. 11, p. 1499–505, 3 jun. 2002.

GREEN, S. J. *et al.* *Leishmania major* amastigotes initiate the L-arginine-dependent killing mechanism in IFN-gamma-stimulated macrophages by induction of tumor necrosis factor-alpha. **Journal of Immunology**, v. 145, n. 12, p. 4290–7, 15 dez. 1990.

GUIMARÃES, L. H. *et al.* Atypical Manifestations of Cutaneous Leishmaniasis in a Region Endemic for *Leishmania braziliensis*: Clinical, Immunological and Parasitological Aspects. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 12, p. 1–14, 2016.

GUPTA, G.; OGHUMU, S.; SATOSKAR, A. R. **Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis**. [s.l.] Elsevier, 2013. v. 82

HOMMEL, M. Visceral leishmaniasis: biology of the parasite. **Journal of Infection**, v. 39, n. 2, p. 101–111, set. 1999.

ILES, K. E.; FORMAN, H. J. Macrophage signaling and respiratory burst. **Immunologic Research**, v. 26, n. 1–3, p. 95–105, 2002.

JHA, S. N.; SINGH, N. K.; JHA, T. K. Changing response to diamidine compounds in cases of kala-azar unresponsive to antimonial. **The Journal of the Association of Physicians of India**, v. 39, n. 4, p. 314–6, abr. 1991.

KHOURI, R. *et al.* DETC induces Leishmania parasite killing in human in vitro and murine in vivo models: a promising therapeutic alternative in Leishmaniasis. **PloS one**, v. 5, n. 12, p. e14394, 21 dez. 2010.

KOCYIGIT, A. *et al.* Antimonial Therapy Induces Circulating Proinflammatory Cytokines in Patients with Cutaneous Leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 12, p. 6589–6591, 1 dez. 2002.

KOPF, M. IL-4-deficient Balb/c mice resist infection with Leishmania major. **Journal of Experimental Medicine**, v. 184, n. 3, p. 1127–1136, 1 set. 1996.

KRAUTH-SIEGEL, R. L.; COMINI, M. A. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1780, n. 11, p. 1236–48, nov. 2008.

KRIEGER, S. *et al.* Trypanosomes lacking trypanothione reductase are avirulent and show increased sensitivity to oxidative stress. **Molecular Microbiology**, v. 35, n. 3, p. 542–552, 5 abr. 2002.

KUNICK, C. *et al.* Evaluation and Comparison of 3D-QSAR CoMSIA Models for CDK1, CDK5, and GSK-3 Inhibition by Paullones. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 47, n. 1, p. 22–36, jan. 2004.

LAINSON, R.; SHAW, J. J. Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. **Nature**, v. 273, n. 5664, p. 595–600, 1978.

LAMY-FREUND, M. T.; FERREIRA, V. F.; SCHREIER, S. Mechanism of inactivation of the polyene antibiotic amphotericin B. Evidence for radical formation in the process of autooxidation. **The Journal of Antibiotics**, v. 38, n. 6, p. 753–7, jun. 1985.

LIEW, F. Y. *et al.* Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Journal of Immunology**, v. 144, n. 12, p. 4794–4797, 1990a.

LIEW, F. Y. *et al.* Macrophage killing of Leishmania parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Journal of Immunology**, v. 144, n. 12, p. 4794–7, 15 jun. 1990b.

LIEW, F. Y. *et al.* Resistance to Leishmania major infection correlates with the induction of nitric oxide synthase in murine macrophages. **European Journal of Immunology**, v. 21, n. 12, p. 3009–3014, 1991.

- LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOTT, S. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN-gamma in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. **Journal of Immunology**, v. 145, n. 12, p. 4306–10, 15 dez. 1990.
- LIEW, F. Y.; WEI, X. Q.; PROUDFOOT, L. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 352, n. 1359, p. 1311–5, 29 set. 1997.
- MACHADO, P. R. L. *et al.* Treatment of Disseminated Leishmaniasis with Liposomal Amphotericin B. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. 6, p. 945–949, 2015.
- MACHADO, P. R. L. *et al.* Tamoxifen and meglumine antimoniate combined therapy in cutaneous leishmaniasis patients: a randomised trial. **Tropical Medicine and International Health**, v. 23, n. 9, p. 936–942, 2018.
- MACHADO, P. R. P. R. *et al.* Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: a randomized and controlled trial. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 12, p. e912–e912, 2010.
- MADEIRA, M. DE F. *et al.* Intralesional Meglumine Antimoniate for Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Patients with Contraindication to Systemic Therapy from Rio de Janeiro (2000 to 2006). **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 87, n. 2, p. 257–260, 1 ago. 2012.
- MAIWALD, F. *et al.* 9- and 11-substituted 4-azapallones are potent and selective inhibitors of African trypanosoma. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 83, p. 274–283, 2014.
- MARINHO, F. A. *et al.* The calpain inhibitor MDL28170 induces the expression of apoptotic markers in *leishmania amazonensis* promastigotes. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.
- MARSDEN, P.; NONATA, R. Mucocutaneous leishmaniasis. A review of clinical aspects. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, p. 309–326, 1975.
- MARY, C. *et al.* Frequency of drug resistance gene amplification in clinical *Leishmania* strains. **International Journal of Microbiology**, v. 2010, 2010.
- MATTHEWS, D. J. *et al.* IL-13 is a susceptibility factor for *Leishmania major* infection. **Journal of Immunology**, v. 164, n. 3, p. 1458–62, 1 fev. 2000.

MESÍAS, A. C. *et al.* Trypanothione synthetase confers growth, survival advantage and resistance to anti-protozoal drugs in *Trypanosoma cruzi*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 130, n. May 2018, p. 23–34, 2018.

MISHRA, J.; SAXENA, A.; SINGH, S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. **Current Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 10, p. 1153–1169, 2007.

MOREIRA, W.; LEPROHON, P.; OUELLETTE, M. Tolerance to drug-induced cell death favours the acquisition of multidrug resistance in *Leishmania*. **Cell Death and Disease**, v. 2, n. 9, p. e201-8, 2011.

MOSKOWITZ, N. H.; BROWN, D. R.; REINER, S. L. Efficient immunity against *Leishmania major* in the absence of interleukin-6. **Infection and Immunity**, v. 65, n. 6, p. 2448–50, jun. 1997.

MUKHERJEE, A. *et al.* The gamma-glutamylcysteine synthetase gene of *Leishmania* is essential and involved in response to oxidants. **Molecular Microbiology**, v. 74, n. 4, p. 914–27, nov. 2009.

MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I.; DE PAULA-COELHO, V. N. Meglumine antimonate directly increases phagocytosis, superoxide anion and TNF-alpha production, but only via TNF-alpha it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, in vitro. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 12, p. 1633–8, 10 dez. 2008.

NICODEMO, A. C. *et al.* Are the severe injuries of cutaneous leishmaniasis caused by an exacerbated Th1 response? **Parasite Immunology**, v. 34, n. 8–9, p. 440–443, ago. 2012.

NOVAIS, F. O. *et al.* Human classical monocytes control the intracellular stage of *leishmania braziliensis* by reactive oxygen species. **Journal of Infectious Diseases**, v. 209, n. 8, p. 1288–1296, 2014.

OLIVEIRA, F. *et al.* Lesion size correlates with *Leishmania* antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 1, p. 70–3, jul. 2011.

ORBAN, O. C. F. *et al.* 5-Substituted 3-chlorokenpauillone derivatives are potent inhibitors of *Trypanosoma brucei* bloodstream forms. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 24, n. 16, p. 3790–3800, 2016.

PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v. 69, n. S1, p. S10–S18, 2014.



PAREDES, Y. *et al.* Intralesional Infiltration with Meglumine Antimoniate for the Treatment of Leishmaniasis Recidiva Cutis in Ecuador. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 97, n. 5, p. 1508–1512, 8 nov. 2017.

PARK, A. Y. *et al.* The Role of IL-12 in Maintaining Resistance to *Leishmania major*. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 11, p. 5771–5777, 1 jun. 2002.

PHAO, P.-A. H. O.; WHO, W. H. O. **Leishmaniasis in the Americas: Treatment recommendation**. [s.l: s.n.].

PINHEIRO, R. O.; ROSSI-BERGMANN, B. Interferon-gamma is required for the late but not early control of *Leishmania amazonensis* infection in C57Bl/6 mice. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 1, p. 79–82, fev. 2007.

PINK, R. *et al.* Opportunities and Challenges in Antiparasitic Drug Discovery. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 4, n. 9, p. 727–740, set. 2005.

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.

REBOUÇAS-SILVA, J. *et al.* Parasite Killing of *Leishmania (V) braziliensis* by Standardized Propolis Extracts. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017.

REICHWALD, C. *et al.* 2-(3-aryl-3-oxopropen-1-yl)-9-tert-butyl-paullones: a new antileishmanial chemotype. **Journal of medicinal chemistry**, v. 51, n. 3, p. 659–65, 14 fev. 2008.

RIBEIRO, J. M. Role of saliva in blood-feeding by arthropods. **Annual review of entomology**, v. 32, n. 92, p. 463–78, jan. 1987.

RIJAL, S. *et al.* Increasing failure of miltefosine in the treatment of Kala-azar in Nepal and the potential role of parasite drug resistance, reinfection, or noncompliance. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 56, n. 11, p. 1530–8, jun. 2013.

RITTIG, M. G.; BOGDAN, C. *Leishmania*-host-cell interaction: complexities and alternative views. **Parasitology Today**, v. 16, n. 7, p. 292–7, jul. 2000.

ROCHA, F. J. S. *et al.* Cytokines, Signaling Pathways, and Effector Molecules Required for the Control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in Mice. **Infection and Immunity**, v. 75, n. 8, p. 3823–3832, 1 ago. 2007.

ROMERO, G. A. *et al.* Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: therapeutic response to meglumine antimoniate. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 5, p. 456–65, nov. 2001.

ROSSI, M.; FASEL, N. How to master the host immune system? *Leishmania* parasites have the solutions! **International Immunology**, v. 30, n. 3, p. 103–111, 2018.

RUGANI, J. N. *et al.* Intraspecies susceptibility of *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* to antileishmanial drugs: Antimony resistance in human isolates from atypical lesions. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 108, n. July, p. 1170–1180, 2018.

RYCZAK, J. *et al.* 2-Arylpauullones are selective antitrypanosomal agents. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 64, p. 396–400, 2013.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews. Immunology**, v. 2, n. 11, p. 845–58, nov. 2002.

SALUD, O. PANAMERICANA DE LA. **Leishmaniasis en las Américas. Recomendaciones para el tratamiento.** [s.l: s.n.].

SANTOS, D. M. *et al.* Chemotherapeutic potential of 17-AAG against cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 8, n. 10, p. e3275, out. 2014.

SANTOS, J. B. *et al.* Antimony plus recombinant human granulocyte-macrophage colony-stimulating factor applied topically in low doses enhances healing of cutaneous Leishmaniasis ulcers: a randomized, double-blind, placebo-controlled study. **The Journal of infectious diseases**, v. 190, n. 10, p. 1793–6, 15 nov. 2004.

SAUDAGAR, P. *et al.* Molecular mechanism underlying antileishmanial effect of oxabicyclo[3.3.1]nonanones: Inhibition of key redox enzymes of the pathogen. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 85, n. 3 PART A, p. 569–577, 2013.

SAUDAGAR, P.; DUBEY, V. K. Cloning, expression, characterization and inhibition studies on trypanothione synthetase, a drug target enzyme, from *Leishmania donovani*. **Biological Chemistry**, v. 392, n. 12, p. 1113–1122, 2011.

SHELLER, J. *et al.* The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**, v. 1813, n. 5, p. 878–888, maio 2011.

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

SILVA, R. E. DA *et al.* Towards a standard protocol for antimony intralesional infiltration technique for cutaneous leishmaniasis treatment. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 2, p. 71–79, fev. 2018.

SINGH, K.; GARG, G.; ALI, V. Current Therapeutics, Their Problems and Thiol Metabolism as Potential Drug Targets in Leishmaniasis. **Current drug metabolism**, v. 17, n. 9, p. 897–919, 2016.

SOSA, M. R. *et al.* IL-13 gene-deficient mice are susceptible to cutaneous *L. mexicana* infection. **European Journal of Immunology**, v. 31, n. 11, p. 3255–60, nov. 2001.

SOUSA, A. F. *et al.* Genetic and chemical analyses reveal that trypanothione synthetase but not glutathionylspermidine synthetase is essential for *Leishmania infantum*. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 73, p. 229–238, 2014.

SPINKS, D. *et al.* Design, synthesis and biological evaluation of *Trypanosoma brucei* Trypanothione Synthetase inhibitors. **ChemMedChem**, v. 7, n. 1, p. 95–106, 2012.

STUHLMANN, F. *et al.* **N5-substituted 2-(6-oxo-6,7-dihydro-5H-benzo[2,3]azepino[4,5-b]indol-5-yl)-acetamides for treating tropical diseases.** [s.l.: s.n.].

SUNDAR, S. *et al.* Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. **Clinical infectious diseases : an official publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 31, n. 4, p. 1104–7, out. 2000.

SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Tropical medicine & international health : TM & IH**, v. 6, n. 11, p. 849–54, nov. 2001.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 16, n. 2, p. 237–252, 22 jan. 2015.

SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and *Leishmania* pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open Biology**, v. 7, n. 9, p. 170165, 13 set. 2017.

THEODOS, C. M. *et al.* Role of tumor necrosis factor in macrophage leishmanicidal activity in vitro and resistance to cutaneous leishmaniasis in vivo. **Infection and Immunity**, v. 59, n. 8, p. 2839–42, ago. 1991.

THOMSON, L.; DENICOLA, A.; RADU, R. The trypanothione–thiol system in *Trypanosoma cruzi* as a key antioxidant mechanism against peroxynitrite-mediated cytotoxicity. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 412, n. 1, p. 55–64, abr. 2003.

TITUS, R. G. *et al.* A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. **Parasite immunology**, v. 7, n. 5, p. 545–55, set. 1985.

TOLLE, N.; KUNICK, C. Paullones as inhibitors of protein kinases. **Current topics in medicinal chemistry**, v. 11, n. 11, p. 1320–1332, 2011.

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

TORRIE, L. S. *et al.* Chemical validation of trypanothione synthetase: A potential drug target for human trypanosomiasis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 52, p. 36137–36145, 2009.

TOVAR, J. *et al.* Evidence that trypanothione reductase is an essential enzyme in *Leishmania* by targeted replacement of the tryA gene locus. **Molecular Microbiology**, v. 29, n. 2, p. 653–660, jul. 1998.

VENTIN, F.; CINCURÁ, C.; MACHADO, P. R. L. Safety and efficacy of miltefosine monotherapy and pentoxifylline associated with pentavalent antimony in treating mucosal leishmaniasis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 16, n. 3, p. 219–225, 4 mar. 2018.

VERWEIJ, J. *et al.* A dose-finding study of miltefosine (hexadecylphosphocholine) in patients with metastatic solid tumours. **Journal of Cancer Research and Clinical Oncology**, v. 118, n. 8, p. 606–608, 1992.

VERWEIJ, J. *et al.* Phase II study of oral miltefosine in patients with squamous cell head and neck cancer. **European journal of cancer (Oxford, England : 1990)**, v. 29A, n. 5, p. 778–9, 1993.

VON STEBUT, E. *et al.* Interleukin 1alpha promotes Th1 differentiation and inhibits disease progression in *Leishmania major*-susceptible BALB/c mice. **The Journal of experimental medicine**, v. 198, n. 2, p. 191–9, 21 jul. 2003.

WADHONE, P. *et al.* Miltefosine promotes IFN-gamma-dominated anti-leishmanial immune response. **Journal of Immunology**, v. 182, n. 11, p. 7146–54, 1 jun. 2009.

WALKER, J. *et al.* Discovery of factors linked to antimony resistance in *Leishmania panamensis* through differential proteome analysis. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 183, n. 2, p. 166–76, jun. 2012.

WEI, X. Q. *et al.* Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Nature**, v. 375, n. 6530, p. 408–11, 1 jun. 1995.

WILHELM, P. *et al.* Rapidly Fatal Leishmaniasis in Resistant C57BL/6 Mice Lacking TNF. **The Journal of Immunology**, v. 166, n. 6, p. 4012–4019, 15 mar. 2001a.

WILHELM, P. *et al.* Rapidly fatal leishmaniasis in resistant C57BL/6 mice lacking TNF. **Journal of Immunology**, v. 166, n. 6, p. 4012–9, 15 mar. 2001b.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis. **World Health Organization Technical Report Series**, n. 949, p. xii–xiii, 1–186, back cover, 2010.

WYLLIE, S. *et al.* Dissecting the essentiality of the bifunctional trypanothione synthetase-amidase in *Trypanosoma brucei* using chemical and genetic methods. **Molecular Microbiology**, v. 74, n. 3, p. 529–540, 2009.

ZIMMERMANN, S. *et al.* Cynaropicrin targets the trypanothione redox system in *Trypanosoma brucei*. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 21, n. 22, p. 7202–7209, 2013.