



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO GONÇALO MONIZ

**Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina
Investigativa**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL QUIMIOTERÁPICO DE UM INIBIDOR DE
HISTONA DEMETILASE CONTRA LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR
*Leishmania (V.) braziliensis***

JÉSSICA LOBO DA SILVA

Salvador - Bahia

2019

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

INSTITUTO GONÇALO MONIZ

Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina

Investigativa

**AVALIAÇÃO DO POTENCIAL QUIMIOTERÁPICO DE UM INIBIDOR DE
HISTONA DEMETILASE CONTRA LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR
*Leishmania (V.) braziliensis***

JÉSSICA LOBO DA SILVA

Orientador: Dr. Leonardo Paiva Farias

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa para obtenção do grau de Mestre.

Salvador – Bahia

2019

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

S586a Silva, Jéssica Lobo.
Avaliação do potencial quimioterápico de um inibidor de histona demetilase
contra Leishmaniose Cutânea causada por *L. (V.) braziliensis*. / Jéssica Lobo
Silva. - 2019.
72 f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo Paiva Farias, Laboratório de
Inflamação e Biomarcadores.

Dissertação (Mestrado de Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa)
Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, 2019.

1. Histona Demetilases. 2. Inflamação. 3. *Leishmania (V) braziliensis*.
I. Título.

CDU 616.993.161

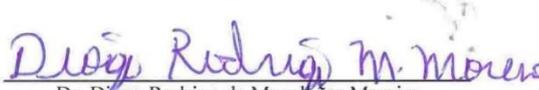
" AVALIAÇÃO DO POTENCIAL QUIMIOTERÁPICO DE UM INIBIDOR DE HISTONA DEMETILASE
CONTRA LEISHMANIOSE CUTÂNEA CAUSADA POR *LEISHMANIA (V.) BRAZILIENSIS*."

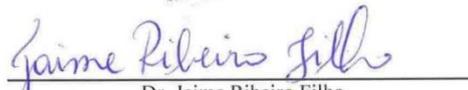
JÉSSICA LOBO DA SILVA

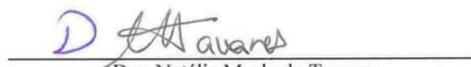
FOLHA DE APROVAÇÃO

Salvador, 30 de outubro de 2019.

COMISSÃO EXAMINADORA


Dr. Diogo Rodrigo de Magalhães Moreira
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ


Dr. Jaime Ribeiro Filho
Pesquisador
IGM/FIOCRUZ


Dra. Natália Machado Tavares
Pesquisadora
IGM/FIOCRUZ

FONTES DE FINANCIAMENTO

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

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer, inicialmente, à minha família e amigos, pelo apoio, incentivo para superar os obstáculos e amor que sempre me foram dado, em especial a minha mãe **Cláudia Aquino Lobo**, meu pai **Antonio Almeida da Silva** e ao meu namorado **Victor Martinez Vidal Pereira**, que está sempre vibrando a cada conquista minha e, acima de tudo, estendendo a mão em cada momento difícil.

Ao meu orientador, Dr. **Leonardo Paiva Farias**, por acreditar no meu potencial, pelos ensinamentos, confiança, apoio e orientação. Toda a minha admiração e respeito.

A todos os meus amigos do IGM, em especial algumas pessoas que os laços de amizade foram mais fortes: **Yuri Tabajara**, **Sayonara Melo**, **Flávio Henrique**, **Mariana Ivo** e **Dayse Lira**.

A todos os **professores** do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia e Medicina Investigativa, por terem me proporcionado um ensino de excelência.

Ao IGM e às suas **plataformas de tecnológicas de microscopia e citometria**, pelas estruturas e suportes profissionais que proporcionaram a minha participação em diversos projetos de pesquisa.

A todos os **membros da biblioteca do IGM** pelo apoio e suporte na revisão da presente dissertação.

À **CAPES** pela concessão da bolsa, imprescindível para a realização deste trabalho.

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Se não sabes, aprende; se já sabes, ensina.”

(Confúcio)

SILVA, Jéssica Lobo. Avaliação do potencial quimioterápico de um inibidor de histona demetilase contra Leishmaniose Cutânea causada por *L. (V.) braziliensis*. 2019. 72f. Dissertação (Mestrado em Biotecnologia em Saúde e Medicina Investigativa) – Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

RESUMO

INTRODUÇÃO: A Leishmaniose Cutânea (LC) causada por *L. (V.) braziliensis* é a forma clínica mais comum da doença no Brasil. A LC está associada à uma resposta inflamatória crônica intensa e ulceração, que podem levar meses ou anos para cicatrizar. Poucas opções terapêuticas, alta toxicidade dos tratamentos e o aparecimento de resistência reforçam a necessidade de tratamentos alternativos. Evidências moleculares sugerem que mecanismos epigenéticos estejam desregulados em doenças inflamatórias crônicas. Desta maneira, reguladores epigenéticos são considerados alvos promissores para melhorar condições inflamatórias crônicas. Após a triagem de uma série de reguladores epigenéticos, um inibidor (GSK-J4) de histonas demetilases (JMJD3 e UTX) demonstrou efeitos positivos no controle da infecção por *L. (V.) braziliensis* em macrófagos humanos. O presente trabalho avaliou o efeito leishmanicida *in vitro* e o potencial quimioterápico deste inibidor de histona demetilase com propriedades anti-inflamatórias contra *L. (V.) braziliensis* no modelo murino de LC.

METODOLOGIA: As concentrações inibitórias de 50% (CI₅₀) para promastigotas e amastigotas foram determinadas por citometria de fluxo e contagem direta utilizando macrófagos murinos, respectivamente. A análise morfológica dos promastigotas foi realizada por Microscopia Eletrônica de Varredura. O efeito leishmanicida nas amastigotas também foi avaliado após exposição ao composto por 24 h e contagem de promastigotas liberados após 8 dias de cultura. A viabilidade de macrófagos murinos expostos ao composto foi avaliada por Alamar Blue. A produção de EROs e NO foram dosados por reação de Griess. A produção de citocinas foi avaliada por citometria de fluxo. E finalmente, o potencial quimioterápico do GSK-J4 foi avaliado através de ensaios *in vivo* utilizando o modelo de infecção de orelha em BALB/C com administrações intralesionais do composto.

RESULTADOS: A partir dos ensaios *in vitro* a CI₅₀ do GSK-J4 foi calculado em 888 nM para promastigotas. Em amastigotas, a CI₅₀ do composto foi estabelecida em 4,5 µM após 24 h de exposição e o índice de seletividade (IS) foi superior a 33,3. Adicionalmente, a exposição $\geq 2,25$ µM GSK-J4 por 24 horas mostrou efeito irreversível sobre a forma amastigota determinada pelo ensaio de liberação. O GSK-J4 a 7,5 µM induziu a produção de NO após 48 horas de tratamento. Adicionalmente, GSK-J4 reduziu níveis de MCP-1 e elevou os níveis de TNF- α em macrófagos infectados. O tratamento intralesional com 50 µM e 100 µM reduziu a carga parasitária nas orelhas e demonstrou ter efeito no desenvolvimento de úlceras, uma vez que 75% camundongos tratados não desenvolveram lesões ulceradas.

CONCLUSÃO: Os dados apresentados sugerem que GSK-J4 apresenta efeito leishmanicida e baixa toxicidade para célula hospedeira. O tratamento mostrou propriedades imunomoduladoras do composto, reduzindo os níveis de MCP-1, e de forma surpreendente, elevando os níveis de TNF- α nas culturas em 24 horas. *In vivo*, o composto reduziu a carga parasitária e o desenvolvimento de úlceras no local da infecção.

Palavras-Chave: GSK-J4, Inibidor de Histona Demetilase, Inflamação, *L. (V.) braziliensis*

SILVA, Jéssica Lobo. Assessing the chemotherapeutic potential of a histone demethylase inhibitor against Cutaneous Leishmaniasis caused by *L. (V.) braziliensis*. 2019. 72f. Dissertation (Master in Biotechnology in Health and Investigative Medicine) –Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2019.

ABSTRACT

INTRODUCTION: Cutaneous Leishmaniasis (LC) caused by *L. (V.) braziliensis* is the most common clinical form of the disease in Brazil. Few therapeutic options, high treatment toxicity and the emergence of drug resistance reinforce the need for alternative treatments. Molecular evidence suggests that epigenetic mechanisms are deregulated in chronic inflammatory diseases. Accordingly, epigenetic regulators are considered promising targets for improving chronic inflammatory conditions. After the screening of a series of epigenetic regulators, the inhibitor (GSK-J4) of histone demethylases (JMJD3 and UTX) showed positive effects on infection control caused by *L. (V.) braziliensis* in human macrophages. The present work assesses the leishmanicidal effect *in vitro* and the chemotherapeutic potential of this histone demethylase inhibitor with anti-inflammatory properties against *L. (V.) braziliensis* in the murine LC model. **METHODS:** The IC₅₀ for promastigotes and amastigotes were determined by flow cytometry and direct counting using murine macrophages, respectively. Morphological analysis of the promastigotes was performed by Scanning Electron Microscopy. The leishmanicidal effect of GSK-J4 on amastigotes was also evaluated after compound exposure (24 h), followed by 8 days of culturing and direct counting of released promastigotes. The viability of murine macrophages exposed to the compound was measured by Alamar Blue. ROS and NO production were measured by Griess reaction. The cytokine production was determined by flow cytometry. Finally, the chemotherapeutic potential of GSK-J4 was evaluated by *in vivo* assays using the ear infection model in BALB/C mice with intralesional administrations of the compound. **RESULTS:** GSK-J4 IC₅₀ was calculated to be 888 nM for promastigotes. The IC₅₀ for amastigotes was established at 4.5 μM after 24 hours of exposure and the selectivity index (SI) was higher than 33.33. Additionally, exposure up to 2.25 μM for 24 hours showed irreversible effects on intracellular amastigotes as determined by a release assay. GSK-J4 (7.5 μM) induced NO production after 48 hours of exposure. Moreover, GSK-J4 reduced the MCP-1 level and increased the TNF-α level in the supernatant of infected macrophages. Intralesional treatment with 50 μM and 100 μM reduced the parasite load in the ears and demonstrated an effect on ulcer development, since 75% of treated mice did not develop ulcerated lesions. **CONCLUSION:** Data presented here demonstrate that GSK-J4 display leishmanicidal properties with low toxicity to the host cell. The treatment revealed immunomodulatory features of the compound, as revealed by reducing levels of MCP-1, and unexpectedly, by increasing levels of TNF-α in treated cultures within 24 hours. *In vivo*, the compound reduced parasite load and ulcer development at the site of infection.

Keywords: GSK-J4, Histone Demethylase Inhibitor, Inflammation, *L. (V.) Braziliensis*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Estrutura de cromatina e modificações de histonas.	20
Figura 2. Regulação da marca H3K27me3 por JMJD3.....	24
Figura 3. Resumo da regulação da enzima JMJD3 via NF- κ B e expressão de genes pró-inflamatórios.	25
Figura 4. Estrutura química do composto GSK-J1, da pró-fármaco GSK-J4 e o seu isômero inativo GSK-J5.	26
Figura 5. Efeito de GSK-J4 sob a demetilase JMJD3	26
Figura 6. Efeito concentração-dependente do composto GSK-J4 <i>in vitro</i> em promastigotas de <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	39
Figura 7. Representação <i>in silico</i> de um domínio JmjC em <i>Leishmania (V.) braziliensis</i>	41
Figura 8. Efeito concentração-dependente de GSK-J4 <i>in vitro</i> em amastigotas de <i>L. (V.) braziliensis</i>	43
Figura 9. Ensaio de viabilidade celular em macrófagos murinos após exposição ao GSK-J4.....	44
Figura 10. Viabilidade intracelular de <i>L. (V.) braziliensis</i> após exposição <i>in vitro</i> ao GSK-J4.....	46
Figura 11. Dosagem indireta <i>in vitro</i> de EROs e NO em sobrenadante de macrófagos murinos infectados por <i>L. (V.) braziliensis</i> após exposição ao GSK-J4.....	50
Figura 13. Tratamento intralesional preliminar com GSK-J4 em um modelo murino de LC causado por <i>L. (V.) braziliensis</i>	52
Figura 14. Desenvolvimento das lesões durante ensaio <i>in vivo</i> preliminar com tratamento intralesional de GSK-J4 em modelo murino de LC causado por <i>L. (V.) braziliensis</i>	53
Figura 15. Tratamento intralesional com GSK-J4 em um modelo murino de LC causado por <i>L. (V.) braziliensis</i>	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Resumo das propriedades farmacológicas de GSK-J4 utilizadas <i>in vitro</i> na literatura.....	28
---	----

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

B.O.D.	Sigla em inglês para Demanda Bioquímica de Oxigênio
CC ₅₀	Concentração Citotóxica Média
CCL5/2	<i>Chemokine (C-C motif) Ligand 5/2</i>
Cels	Células
CEUA	Comissão de Experimentação e Uso de Animais
CI ₅₀	Concentração Inibitória de 50%
CI ₉₀	Concentração Inibitória de 90%
CO ₂	Dióxido de Carbono
Ctrl	Controle
DC	Sigla em inglês para Célula Dendrítica
DIPG	Sigla em inglês para Glioma Pontino Difuso Intrínseco
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Sigla em inglês para Ácido Desoxirribonucleico
Dra	Doutora
EAE	Sigla em inglês para Encefalomielite Autoimune
EDTA	Sigla em inglês para Ácido Etilenodiamino
EROs	Espécies Reativas de Oxigênio
Ezh2	<i>Enhancer of Zeste Homolog 2</i>
Fe	Ferro
FL1	<i>Friend leukemia integration 1</i>
GM-CSF	Sigla em inglês para Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos e Macrófagos
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
H3K27	Lisina 27 da Histona H3
H3K27me3	Trimetilação da Lisina 27 da Histona H3
H3K36	Lisina 36 da Histona H3
H3K4	Lisina 4 da Histona H3
H3K4ac	Acetilação da Lisina 4 de Histona H3
H3K79	Lisina 79 da Histona H3
H3K9	Lisina 9 da Histona H3
H3K9ac	Acetilação da Lisina 9 de Histona H3
H ₃ PO ₄	Ácido Fósfórico
H3S10ph	Fosforilação da Serina 10 de Histona 3
H4K20	Lisina 20 da Histona H4
HDAC	Histona Deacetilase
HDMTs	Histona Demetilases
HMTs	Histona Metiltransferases
IFN- γ	Interferon Gama

IL-1 β / 2 / 4 / 6 / 10 / 12	Interleucina-1 β / 2 / 4 / 6 / 10 / 12
iNOS	Sigla em inglês para Óxido Nítrico Sintase Induzível
IRF7	Sigla em inglês para Fator Regulador de Interferon
IS	Índice de Seletividade
JAK	Sigla em inglês para Janus quinase
JmjC	<i>Jumonji</i> Carboxi-Terminal
JMJD3	<i>Jumonji</i> D3
KDM	Sigla em inglês para Lisina Demetilase
LC	Leishmaniose Cutânea
LM	Leishmaniose Mucocutânea
LPS	Lipopolissacarídeo
LSD	Sigla em inglês para Demetilase Lisina-Específica
LV	Leishmaniose Visceral
MCP-1	Sigla em inglês para Proteína Químioatraente de Monócitos-1 Sigla em inglês para Fator Estimulador de Colônias de Macrófagos
M-CSF	
miRNAs	MicroRNAs
MPTs	Modificações Pós-Traducionais de Histonas
ND	Não Determinado
NF- κ B	Sigla em inglês para Fator Nuclear Kappa B
NO	Sigla em inglês para Óxido Nítrico
NO ₂ -	Nitrito
OMS	Organização Mundial da Saúde
P&D	Pesquisa e Desenvolvimento
PBMCs	Sigla em inglês para Células Mononucleares do Sangue Periférico
PBS	Sigla em inglês para Tampão Fosfato Salino
PKDL	Leishmaniose Dérmica Pós-calazar
PRC1 / 2	Complexo Policombo Repressivo 1 / 2
RNA	Sigla em inglês para Ácido Ribonucleico
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
Sb ^v	Sigla em inglês para Antimonial Pentavalente
SFB	Soro Fetal Bovino
SGC	Sigla em inglês para Consórcio de Genômica Estrutural
T-ALL	Sigla em inglês para Leucemia Linfoblástica Aguda de Células T
Th1 / 2 / 17	Sigla em inglês para Resposta T auxiliar 1 / 2 / 17
TNF- α	Sigla em inglês para Fator de Necrose Tumoral Alfa
U	Unidade <i>Ubiquitously Transcribed Tetratricopeptide Repeat Protein X-linked</i>
UTX	
p/v	Peso/Volume
v/v	Volume/Volume

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
2	REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1	LEISHMANIOSE CUTÂNEA	16
2.1.1	Aspectos inflamatórios da resposta imune na doença	16
2.1.2	Limitações e perspectivas dos tratamentos atuais para LC	18
2.2	MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICAS COMO ALVO TERAPÊUTICO PARA LEISHMANIOSE	19
2.2.1	Modificações nas caudas de histonas	19
2.2.2	A importância da regulação epigenética na interação parasito-hospedeiro	21
2.3	O PAPEL DA ENZIMA JMJD3 NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA	22
2.4	GSK-J4	25
3	JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE	29
4	OBJETIVOS	30
4.1	OBJETIVO GERAL	30
4.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
5	MATERIAIS E METÓDOS	31
5.1	COMPOSTOS	31
5.2	CULTIVO DOS PARASITOS	31
5.3	ENSAIO DE VIABILIDADE DA FORMA PROMASTIGOTA	31
5.4	AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DE PROMASTIGOTAS EXPOSTOS AO GSK- J4	32
5.5	ANÁLISES <i>IN SILICO</i>	32
5.6	SEPARAÇÃO E CULTURA DE MACRÓFAGOS DE MEDULA	33
5.7	INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS	33

5.8	AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO GSK-J4 CONTRA AMASTIGOTAS INTRACELULARES _____	34
5.9	VIABILIDADE INTRACELULAR DE AMASTIGOTAS APÓS EXPOSIÇÃO AO COMPOSTO _____	34
5.10	ENSAIO DE VIABILIDADE EM MACRÓFAGOS _____	35
5.11	DOSAGEM DE CITOCINAS/QUIMIOCINAS INFLAMATÓRIAS _____	35
5.12	DOSAGEM INDIRETA DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E ÓXIDO NÍTRICO _____	35
5.13	TRATAMENTO INTRALESIONAL DE CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS COM <i>L. (V.) BRAZILIENSIS</i> COM GSK-J4 _____	36
5.14	QUANTIFICAÇÃO DE PARASITOS POR DILUIÇÃO LIMITANTE _____	37
5.15	ANÁLISES ESTATÍSTICAS _____	37
6	RESULTADOS _____	38
6.1	GSK-J4 APRESENTA ATIVIDADE LEISHMANICIDA CONTRA PROMASTIGOTAS DE <i>L. (V.) BRAZILIENSIS</i> _____	38
6.2	<i>LEISHMANIA (V.) BRAZILIENSIS</i> NÃO APRESENTA ORTÓLOGOS DA ENZIMA JMJD3 EM SEU GENOMA _____	40
6.3	GSK-J4 APRESENTA ATIVIDADE LEISHMANICIDA CONTRA AMASTIGOTAS DE <i>L. (V.) BRAZILIENSIS</i> _____	42
6.4	GSK-J4 NÃO COMPROMETE A VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS MURINOS <i>IN VITRO</i> _____	44
6.5	AMASTIGOTAS INTRACELULARES PERMANECEM INVIÁVEIS APÓS EXPOSIÇÃO A BAIXAS CONCENTRAÇÕES DE GSK-J4 _____	45
6.6	GSK-J4 NÃO INDUZIU PRODUÇÃO DE EROS E NO EM MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS ATÉ 24 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO COMPOSTO _____	47
6.7	GSK-J4 É CAPAZ DE REDUZIR MCP-1 E AUMENTAR TNF- α EM MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS _____	49
6.8	TRATAMENTO INTRALESIONAL COM GSK-J4 REDUZ CARGA PARASITÁRIA E EVITA ULCERAÇÃO EM MODELO MURINO DE LC _____	51

7	DISCUSSÃO	55
8	CONCLUSÃO	62
	REFERÊNCIAS	63
	ANEXOS	71

1 INTRODUÇÃO

As leishmanioses pertencem ao grupo de doenças tropicais negligenciadas que causam significativo impacto em países em desenvolvimento. Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a leishmaniose é uma das seis maiores endemias do planeta, uma vez que cerca de 1 bilhão de pessoas vivem em áreas de risco e estima-se que ocorram cerca de 1,3 milhões de novos casos anualmente (Análise Preliminar Para P&D De Leishmaniose, OMS, 2017). Em 2014, mais de 90% dos novos casos notificados de leishmaniose ocorreram em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (OMS, 2016).

A leishmaniose apresenta quatro principais formas clínicas: Leishmaniose Visceral (LV, também conhecida como calazar), Leishmaniose Dérmica Pós-calazar (PKDL), Leishmaniose Cutânea (LC) e Leishmaniose Mucocutânea (LM) (PEARSON; DE QUEIROZ SOUSA, 1996). Dentre as principais formas clínicas, a LV é a forma mais grave da doença, sendo quase sempre fatal se não tratada a tempo (WHA et al., 2017). Por outro lado, a forma mais comum da doença é a Leishmaniose Cutânea. A forma cutânea é endêmica em 18 países das Américas e 70% dos casos mundiais ocorreram em 10 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, República Islâmica do Irã, Peru, Sudão e República Árabe da Síria (FOCUS, 2016).

As manifestações de LC abrangem um amplo espectro de gravidade e aspectos clínicos que resultam da interação de dois fatores principais: a espécie do parasito e o estado imunológico do hospedeiro (GARNIER; CROFT, 2002). No Brasil, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *L. (Viannia) guyanensis* e *L. (Viannia) braziliensis* são as principais causadoras da doença, sendo a *L. (V.) braziliensis* a mais frequente (Ministério da Saúde, 2017).

De forma geral, a LC causada por *Leishmania (V.) braziliensis* está associada à uma resposta inflamatória crônica e ulceração (RETHI; EIDSMO, 2012). A patologia tecidual e a progressão da lesão estão associados a uma resposta imune do hospedeiro aos antígenos do parasito (ANTONELLI et al., 2005; OLIVEIRA et al., 2011). Apesar das lesões curarem de forma espontânea, isso pode levar meses ou anos. Além disso, causam cicatrizes graves e permanentes, gerando discriminação e estigma (OMS, 2009).

O tratamento para LC ainda conta com poucas opções de drogas, as quais são tóxicas e de difícil administração. O surgimento de resistência juntamente com a ausência de marcadores moleculares padronizados para sua detecção torna a situação ainda mais crítica (CROFT; OLLIARO, 2011). Estratégias atuais para descoberta de novos tratamentos baseiam-se principalmente no redirecionamento de compostos já validados. Tais estratégias levam em consideração a capacidade do composto em modular alvos no agente etiológico da doença ou

no hospedeiro, ou reverter um perfil fenotípico causado pela doença (revisado em (NAGLE et al., 2014)). Tendo em vista este cenário, uma das abordagens atuais para desenvolvimento de novos tratamentos baseia-se em estratégias terapêuticas dirigidas ao hospedeiro. O intuito dessas estratégias é identificar moléculas alvo envolvidas na resposta imune e nas vias metabólicas e bioquímicas essenciais para a viabilidade intracelular ou infectividade do parasito. Além disso, busca-se interferir na regulação da resposta imune do hospedeiro afim de diminuir a imunopatologia da doença (revisado em (LAMOTTE et al., 2017)).

Seguindo esse racional, nosso grupo de pesquisa em colaboração com a Dra. Susanne M. Knapp (Universidade de Oxford / Structural Genomics Consortium - SGC) realizou ensaios exploratórios com uma série de inibidores de proteínas com bromodomínio e histona demetilases utilizando o modelo de infecção *in vitro* com *L. (V.) braziliensis* em macrófagos humanos. Tais inibidores possuem como alvo moléculas envolvidas na resposta inflamatória (revisado em (ARROWSMITH et al., 2012)). Nestes ensaios preliminares, um inibidor de histona demetilase (GSK-J4), reduziu a taxa de infecção de macrófagos humanos em 63% após 24 horas de tratamento. GSK-J4 é um inibidor de histona demetilase seletivo para as enzimas JMJD3 e UTX. O composto foi descrito originalmente por modular a resposta pró-inflamatória de macrófagos de paciente com Artrite Reumatoide (KRUIDENIER et al., 2012). Nesse contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial quimioterápico do inibidor de histona demetilase com propriedades anti-inflamatórias (GSK-J4) contra *Leishmania (V.) braziliensis* no modelo murino de Leishmaniose Cutânea.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. LEISHMANIOSE CUTÂNEA

A Leishmaniose Cutânea é uma doença tropical não contagiosa causada por um parasito intracelular do gênero *Leishmania*. Nas Américas, os vetores de transmissão da doença são as fêmeas de flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* infectadas (Ministério da Saúde, 2017). No momento do repasto sanguíneo do mosquito, a forma promastigota móvel e flagelada de *Leishmania* é inoculada no hospedeiro e rapidamente fagocitada por neutrófilos, macrófagos e células dendríticas. Dentro das células hospedeiras, os promastigotas se transformam na forma amastigota aflagelada. Em seguida, o protozoário se multiplica por fissão binária e infecta outras células. O ciclo se completa quando o flebotomíneo suga o sangue de um mamífero contaminado. No trato intestinal do flebótomo estes amastigotas irão se transformar novamente em promastigotas, migrar para a probóscide e, assim, reiniciar o ciclo (revisado em (KAYE; SCOTT, 2011)).

A Leishmaniose Cutânea (LC) é a manifestação clínica prevalente da forma cutânea (SCORZA; CARVALHO; WILSON, 2017), sendo *L. (V.) braziliensis* a principal espécie causadora da doença no Brasil (Ministério da Saúde, 2017). A principal característica clínica é o aparecimento de lesões encontradas exclusivamente na pele, iniciando-se no local em que as formas promastigotas infectantes foram inoculadas. A lesão inicia com um pequeno eritema que evolui para uma pápula, depois em um nódulo que progride para uma lesão ulcerativa (revisado em (ABDOLI; MASPI; GHAFFARIFAR, 2017)). A úlcera típica de LC é indolor com formato arredondado ou ovalado com base eritematosa, infiltrada e de consistência firme, possui bordas bem-delimitadas e elevadas com fundo avermelhado e com granulações grosseiras (Ministério da Saúde, 2017).

2.1.1. Aspectos Inflamatórios da Resposta Imune na Doença

A diversidade de manifestações clínicas da leishmaniose é consequência de uma interação complexa entre o parasito e a resposta imune do hospedeiro. Estudos utilizando modelos experimentais murinos de LC revelaram uma dicotomia entre citocinas associadas a resposta T *helper* 1 (Th1), mediando a proteção, e citocinas associadas a resposta T *helper* 2 (Th2), mediando a suscetibilidade (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999; ROSAS et al., 2005). Embora a dicotomia Th1/Th2 seja claramente observada no modelo experimental de LC em murinos, ainda não foi possível demonstrá-la claramente em humanos já que os

fatores envolvidos na resposta imune do hospedeiro e o desfecho da doença são mais complexos (CASTELLANO et al., 2009).

A capacidade do hospedeiro de controlar a infecção e resolver a doença requer a geração de resposta celular imune capaz de ativar macrófagos a fim de eliminar parasitos intracelulares. Em humanos e modelos experimentais murinos de LC, o controle da infecção é mediado por linfócitos T e dependente da indução de uma resposta imune do tipo Th1 dirigida por interleucina-12 (IL-12) e a produção de interferon gama (IFN- γ) pelas células T CD4+ (ALEXANDER et al., 2000; ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999; ROSAS et al., 2005; STÄGER et al., 2003; TRIPATHI; SINGH; NAIK, 2007).

Ao infectar o hospedeiro, o parasito interage com diferentes tipos celulares da resposta imune inata, incluindo neutrófilos, macrófagos e células dendríticas (LIMA et al., 1998; MÜLLER et al., 2001). Os macrófagos possuem papel importante durante a infecção por *Leishmania* uma vez que servem como principal tipo celular hospedeiro para o parasito, agem como células apresentadoras de antígeno e secretam moléculas que induzem resposta inflamatória, além de estarem envolvidos na imunopatogenia da doença (GIUDICE et al., 2012; RIBEIRO-GOMES et al., 2014; VAN ZANDBERGEN et al., 2004). Os principais mecanismos de controle da carga parasitária da resposta imune inata são espécies reativas de oxigênio (EROs) e óxido nítrico (NO) produzidos pelos macrófagos após a ativação por IFN- γ e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) (revisado em (SCOTT; NOVAIS, 2016)).

O processo intenso de recrutamento e ativação de células inflamatórias no local da lesão também exerce um papel importante no desenvolvimento da úlcera e destruição tecidual. Macrófagos ativados de pacientes com LC produzem grandes quantidades de quimiocinas pró-inflamatórias que atraem neutrófilos, monócitos e células T ativadas e induzem uma reação inflamatória intensa e uma ação deletéria às células saudáveis do hospedeiro, contribuindo para a patologia associada à infecção por *L. (V.) braziliensis* (GIUDICE et al., 2012). Pacientes com lesões crônicas apresentam forte expressão de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α (MELBY et al., 1994). Existe uma associação entre produção de IFN- γ e TNF- α e tamanho da lesão, assim como o aparecimento de formas mais graves da doença (ANTONELLI et al., 2005). Além disso, sabe-se que esse processo inflamatório permanece ativo mesmo após a diminuição significativa da carga parasitária em infecções causadas por *L. (V.) braziliensis*, mantendo um círculo vicioso de ativação celular (BACELLAR et al., 2002; BITTENCOURT; BARRAL, 1991; SALDANHA et al., 2017).

2.1.2. Limitações e perspectivas dos tratamentos atuais para LC

No Brasil, o tratamento de primeira escolha para LC é o antimoniato de meglumina (Glucantime®) pertencente ao grupo dos antimoniais pentavalentes (Sb^V) e anfotericina B lipossomal (AmBisome®). Os tratamentos de segunda escolha consistem em desoxicolato de anfotericina B (Fungizone®) e isetionato de pentamidina (Pentam®) (Ministério da Saúde, 2017). Os atuais tratamentos utilizados para leishmaniose não são considerados ideais apresentando limitações, como intensos efeitos colaterais, alta toxicidade e alto custo (RAHMAN et al., 2017; SUNDAR; JAYA, 2010; VERMA et al., 2017; ZULFIQAR; SHELPER; AVERY, 2017). No entanto, a principal limitação dos tratamentos atuais é a crescente falha terapêutica e o surgimento de parasitos resistentes às drogas (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; LAFFITTE et al., 2016; PONTE-SUCRE et al., 2017). Além disso, a resposta inflamatória exagerada provoca danos teciduais significativos, o que contribui para diminuição da taxa de cura da LC (GIUDICE et al., 2012).

Desta forma, a estratégia que vem sendo utilizada é a terapia combinada de leishmanicidas com drogas imunomoduladoras. Dois ensaios clínicos utilizaram uso tópico intralesional ou em curativo do fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) associado ao tratamento convencional com Sb^V em pacientes com LC. O fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos GM-CSF é capaz de modular a resposta imune tecidual com aumento da produção de IL-10, diminuindo a produção local de IFN- γ e TNF- α . Em tais ensaios, houve um aumento na taxa de cura de 50% (grupo Sb^V + placebo) para 80% (Sb^V + GM-CSF, intralesional) a 100% (Sb^V + GM-CSF, curativo). Além disso, a associação Sb^V + GM-CSF acelerou o tempo de cicatrização da úlcera (ALMEIDA et al., 1999; SANTOS et al., 2004). Em 2005, outro estudo com um grupo de pacientes com LC refratária (sem cura após pelo menos 3 séries de tratamento com Sb^V) demonstrou que o uso tópico de uma solução de 10 $\mu\text{g/mL}$ de GM-CSF na lesão ulcerada associada a um tratamento com Sb^V foi capaz de curar todos os casos (ALMEIDA et al., 2005). Outro exemplo da utilização combinada de imunomodulador é a associação de pentoxifilina por via oral e Sb^V . Em 10 casos refratários de Leishmaniose Mucocutânea (LM) (ausência de cura após pelo menos 3 séries de Sb^V), a associação de pentoxifilina apresentou cura em 90% dos pacientes. O uso da pentoxifilina se baseia na inibição de produção de TNF- α . Posteriormente, um ensaio clínico em pacientes com LM sem tratamento anterior mostrou taxa de cura de 100% no grupo que utilizou a associação em comparação ao grupo controle que fez uso apenas de Sb^V e placebo, cuja taxa de cura foi de 58% (LESSA et al., 2001; MACHADO et al., 2007). Atualmente, o

Ministério da Saúde do Brasil recomenda a associação da pentoxilina ao tratamento convencional com Sb^v em casos de LM (Ministério da Saúde, 2017).

Portanto, a associação de drogas imunomoduladoras aos tratamentos com drogas com efeito leishmanicida pode contribuir para diminuir a inflamação e dano tecidual, facilitando assim a destruição do agente parasitário pelo hospedeiro e ação da droga leishmanicida.

2.2. MODIFICAÇÕES EPIGENÉTICAS COMO ALVO TERAPÊUTICO PARA LEISHMANIOSE

O termo epigenética abriga uma variedade de mudanças hereditárias na expressão gênica que estão ligadas a modificações estruturais na cromatina, sem envolver mudanças na sequência de DNA (MEHTA; JEFFREY, 2015). Essas modificações estruturais ocorrem, principalmente, por meio da metilação do DNA, modificações pós-traducionais de histonas (MPTs) e miRNAs. As modificações epigenéticas ocorrem em resposta a estímulos do macro e microambiente e desempenham um papel fundamental na expressão gênica após esses estímulos, por exemplo, dieta, poluição, infecções e outros fatores ambientais tem efeitos profundos nas modificações epigenéticas, disparando a susceptibilidade a doenças e influenciando o desfecho clínico (BAYARSAIHAN, 2011).

2.2.1. Modificações nas caudas de histonas

Em eucariotos, o nucleossomo é a menor unidade estrutural da cromatina, na qual 146 pares de bases de DNA estão envoltos em um octâmero de histonas composto por duas cópias de cada uma delas: H2A, H2B, H3 e H4 (Figura 1A). Uma das formas importantes de controle da expressão gênica via reguladores epigenéticos é a modificação da cromatina e seu remodelamento por meio de modificações pós-traducionais de histonas. As porções N-terminais das histonas se projetam para fora dos nucleossomos como estrutura de caudas flexíveis e, portanto, essas regiões são mais susceptíveis à MPTs (Figura 1A). As modificações bioquímicas nas histonas são inseridas por enzimas modificadoras *writers*, reconhecidas por enzimas *readers* e a remoção é realizada por enzimas *erasers*. Tais modificações químicas, como metilação, acetilação, fosforilação e ubiquitinação de histonas desempenham papéis distintos na regulação da transcrição gênica (Figura 1B) (MEHTA; JEFFREY, 2015).

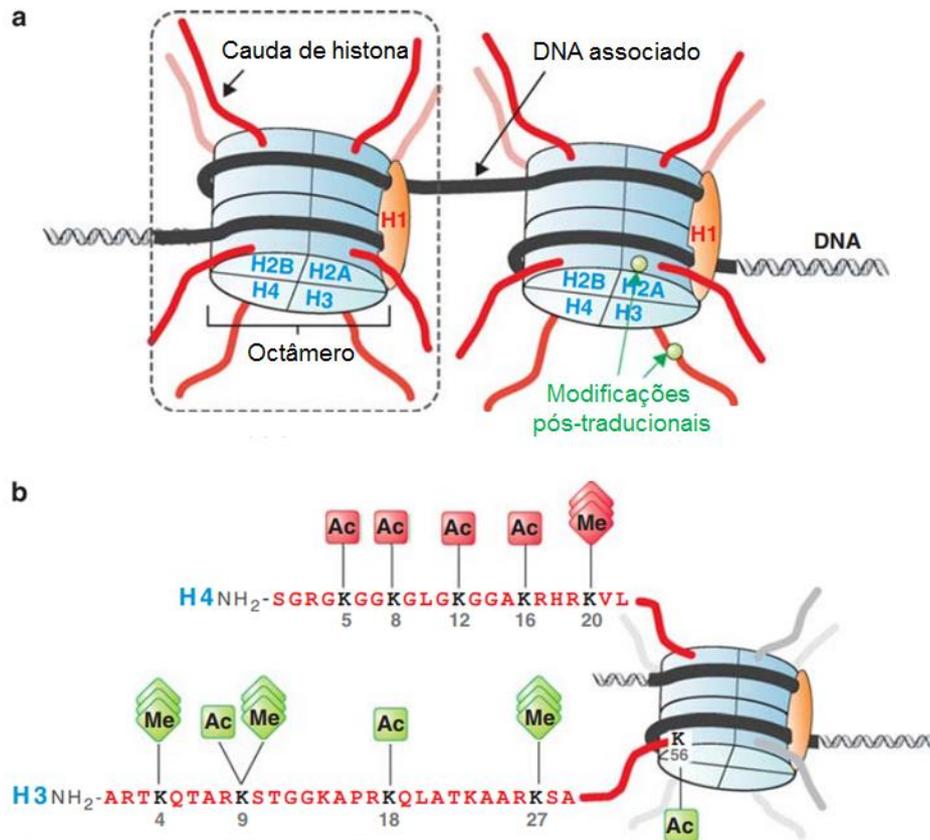


Figura 1. Estrutura de cromatina e modificações de histonas. (A) A cromatina é composta por unidades repetidas de nucleossomos, estes constituídos pela fita de DNA enrolada em torno de um octâmero de histonas - duas cópias de cada uma: H2A, H2B, H3 e H4. As histonas estão sujeitas à modificações pós-traducionais, principalmente em suas caudas N-terminais. (B) Exemplos de modificações de histonas: Acetilações e trimetilações em lisinas das histonas H3 e H4. Fonte: adaptado de (FÜLLGRABE; KAVANAGH; JOSEPH, 2011).

Essas modificações afetam a função dos cromossomos através de dois mecanismos distintos. Primeiramente, através da alteração da carga eletrostática das histonas o que pode mudar propriedades estruturais das histonas e ligantes do DNA. Além disso essas modificações podem criar, estabilizar, romper ou ocluir domínios de interação na cromatina para proteínas regulatórias, como fatores de transcrição, proteínas envolvidas na condensação da cromatina e reparo de DNA (MEHTA; JEFFREY, 2015).

A combinação variada de múltiplas MPTs de histonas levou a proposta da existência de um “código de histonas”, que sugere que modificações de resíduos específicos de diversas histonas, agindo sequencialmente ou em combinação desencadeiam uma determinada função biológica. Em outras palavras, a presença de uma dada modificação pode facilitar ou impedir que uma segunda modificação aconteça; e essas modificações podem induzir níveis distintos de organização da cromatina. Este código fornece um controle adicional que dita os níveis da

expressão gênica e isso é mediado principalmente através da interação proteica. Em combinação com o código do DNA, o código das histonas fornece uma rede sinalizadora de enorme complexidade que permite que a expressão gênica seja finamente modulada (revisado em (RUTHENBURG et al., 2007)).

A acetilação de histonas é a modificação que desencadeia o fenótipo menos variável, sendo associada de um modo geral a ativação da transcrição gênica. Por outro lado, a metilação de histonas pelas histonas metiltransferases (HMTs) resulta em uma maior diversidade de efeitos. Por exemplo, a metilação de H3K4, H3K36 e H3K79 está associada a ativação da transcrição, já as tri-metilação de H3K9, H3K27 e H4K20 está associada a repressão da transcrição e silenciamento da cromatina (revisado em (LEWIS et al., 2014)).

A metilação de histonas ocorre pela ação de HMTs, enquanto a remoção do grupo metil ocorre pela ação de histona demetilases (HDMTs), que são classificadas em duas famílias: a família *Jumonji* carboxi-terminal (JmjC) e família de demetilases lisina-específicas (LSD ou KDM) (revisado por (KLOSE; KALLIN; ZHANG, 2006)).

2.2.2. A importância da regulação epigenética na interação parasito-hospedeiro

Como mencionado anteriormente, as marcas epigenéticas participam da integração de sinais ambientais a nível celular, sendo de grande importância o seu papel nas doenças relacionadas à dieta, estilo de vida, infecções e exposição a toxinas. Dessa forma, alvos epigenéticos apresentam relevância terapêutica em múltiplas doenças, como câncer, doenças inflamatórias, doenças metabólicas e doenças parasitárias (ARROWSMITH et al., 2012; BAYARSAIHAN, 2011).

A regulação epigenética em doenças parasitárias já foi descrita como um mecanismo pelo qual o patógeno altera a função da célula hospedeira a fim de promover sua sobrevivência e, especialmente no caso de patógenos intracelulares, para gerar um ambiente adequado para a replicação dentro da célula hospedeira (SILMON DE MONERRI; KIM, 2014). A infecção por *Toxoplasma gondii*, por exemplo, bloqueia a fosforilação da serina 10 de Histonas 3 (H3S10ph) e a acetilação das lisinas 4 e 9 (H3K4ac e H3K9ac) no promotor do gene TNF- α , desta forma promovendo a diminuição transcricional desta citocina pro-inflamatória (LENG et al., 2009). De forma semelhante, o decréscimo da acetilação de histonas durante a infecção por *T. gondii* tem sido relacionada a alteração da ligação de STAT1 em promotores regulados por IFN- γ , a qual é revertida após o tratamento com inibidores de histona deacetilases (COCK-RADA et al., 2012). Além de *T. gondii* existem evidências que *Theileria*, *Listeria monocytogenes*, *Chlamydia*

trachomatis e *Legionella pneumophila* são capazes de promover modificações na cromatina da célula hospedeira (SILMON DE MONERRI; KIM, 2014).

Pouquíssima informação está disponível sobre o impacto epigenético promovido pela infecção por *Leishmania* na célula hospedeira. Um estudo *in vitro* demonstrou que *L. donovani* promove alterações no perfil de metilações do DNA de macrófagos, de modo a interferir com genes envolvidos na resposta antimicrobiana do hospedeiro (MARR et al., 2014). Em 2017, Almeida e colaboradores (2017) demonstraram em macrófagos de pacientes com LC que a infecção causada por *L. (V.) braziliensis* altera o padrão de metilação do DNA no promotor do gene FL1 (ALMEIDA et al., 2017). Recentemente, foi descrito que *L. amazonensis* induz a expressão de uma histona deacetilase (HDAC1) em macrófagos humanos infectados, tanto *in vitro* quanto em amostras clínicas humanas. Nesse estudo, demonstrou-se que a HDAC1 é recrutada pelo complexo p50/p50 NF- κ B para o promotor iNOS, levando à desacetilação da histona H3K9 e à regulação negativa do gene iNOS, reduzindo os níveis de NO (CALEGARI-SILVA et al., 2018).

Embora seja recente os estudos sobre o impacto da infecção por *Leishmania* no epigenoma do hospedeiro, há evidências sobre o impacto da infecção na transcrição de vários genes envolvidos em diversas vias celulares, como imunossupressão, imortalização celular e desvio das vias metabólicas da célula hospedeira (Revisado em (LAMOTTE et al., 2017)). Dessa forma, a investigação dessas interações sob a perspectiva das modificações epigenéticas podem contribuir para identificações de vias de regulação gênica, identificação de biomarcadores e vias para intervenção quimioterápica.

2.3. O PAPEL DA ENZIMA JMJD3 NA RESPOSTA INFLAMATÓRIA

A pele é a principal barreira contra o ambiente externo. Após uma lesão, a resolução rápida da ferida e a regeneração imediata da pele danificada são fundamentais para restaurar sua função protetora. O reparo efetivo requer comunicação e interação entre muitos tipos de células e este processo é regulado em múltiplos níveis. A transição da fase inflamatória para a cicatrização representa um passo fundamental durante a cicatrização de feridas (revisado em (LANDÉN; LI; STÅHLE, 2016)).

A sinalização de NF- κ B é a principal via de indução e controle das respostas inflamatórias. Alguns estudos revelaram que a histona demetilase Jumonji D3 (JMJD3) é uma potente ativadora de genes pró-inflamatórios, tipicamente ligados à ativação da via de sinalização de NF- κ B (DAS et al., 2012; DE SANTA et al., 2009; LEE et al., 2012). A enzima

JMJD3 é responsável pela remoção da trimetilação da lisina 27 da histona H3 (H3K27me3) (AGGER et al., 2007; DE SANTA et al., 2007; LAN et al., 2007; XIANG et al., 2007).

Como mencionado anteriormente, a trimetilação da lisina 27 na histona H3 (H3K27me3) em mamíferos está relacionada ao silenciamento de genes (LUND; VAN LOHUIZEN, 2004). A adição desta trimetilação é catalisada pela enzima Ezh2, que se associa com Suz12, Eed e RbAp48 para formar o complexo policombo repressivo 2 (PRC2) (Figura 2A) (KUZMICHEV et al., 2002; MÜLLER et al., 2002; PLATH et al., 2003). A presença da marca H3K27me3 favorece o subsequente recrutamento do complexo policombo repressivo 1 (PRC1), o qual facilita a condensação da cromatina e formação de heterocromatina. Esta por sua vez limita o acesso a maquinaria de transcrição ao DNA, suprimindo desta maneira a expressão gênica (Figure 2A) (FRANCIS; KINGSTON; WOODCOCK, 2004; MIN; ZHANG; XU, 2003; PLATH et al., 2003). Este padrão pode ser alterado pela ação da histona demetilase JMJD3 que é capaz de retirar a trimetilação de H3K27me3 através de uma reação oxidativa que requer Fe (II) e α -cetoglutarato como cofatores, permitindo assim a transcrição gênica (Figura 2B) (AGGER et al., 2007; DE SANTA et al., 2007; KLOSE; KALLIN; ZHANG, 2006; LAN et al., 2007; XIANG et al., 2007).

De Santa e colaboradores (2009) demonstraram que o tratamento de macrófagos derivados da medula óssea com LPS desencadeia o recrutamento de JMJD3 para o sítio de início de transcrição de milhares de genes. Ao passo que, a supressão de JMJD3 diminuiu a expressão de vários genes, principalmente os envolvidos na resposta inflamatória (DE SANTA et al., 2009). Além disso, Das e colaboradores (2012) observaram que a modulação negativa da expressão de JMJD3 afetou a transcrição de uma rede de genes inflamatórios (citocinas, quimiocinas e receptores imunes) dependentes de NF- κ B em células THP-1 (DAS et al., 2012).

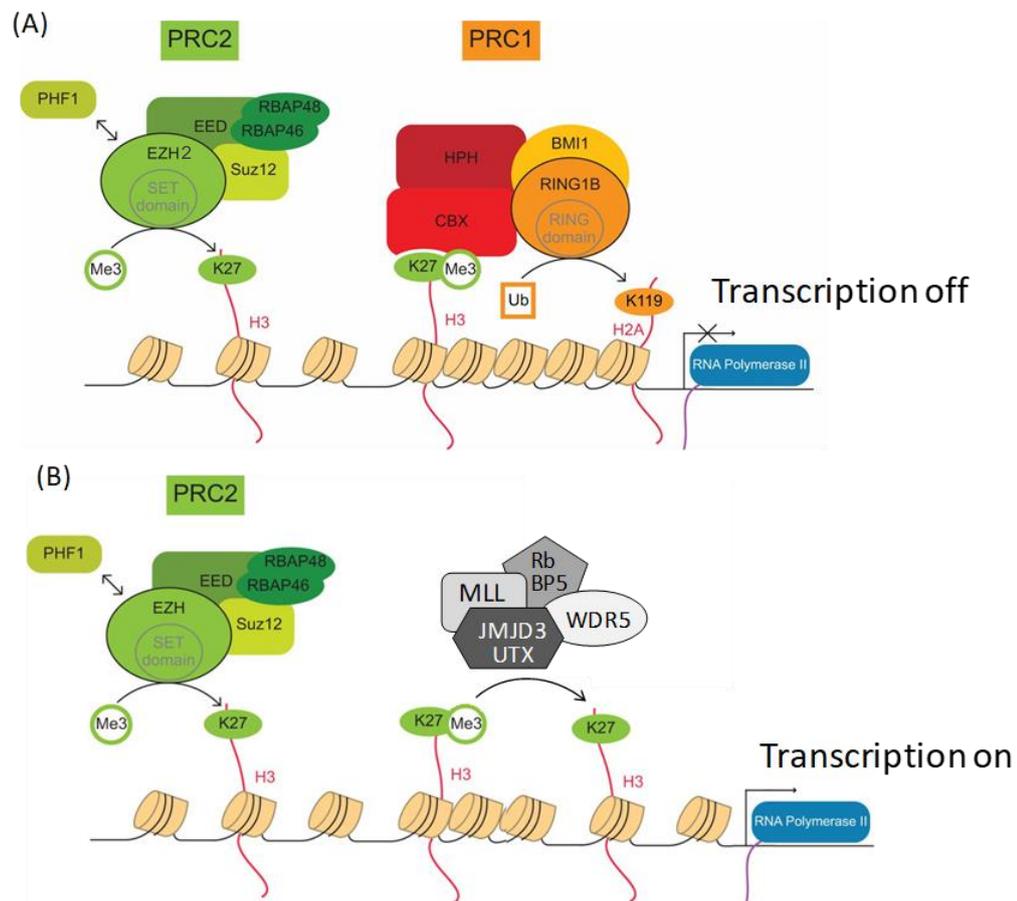


Figura 2. Regulação da marca H3K27me3 por JMJD3. (A) Esquema demonstrando o processo de silenciamento gênico mediado pelo complexo policombo repressivo 2 (PRC2). (B) Ativação da expressão gênica mediada pela remoção da marca H3K27me3 e H3K27me2 pelas demetilases JMJD3 e UTX, respectivamente. Fonte: adaptado de: (YOO; HENNIGHAUSEN, 2011).

A enzima JMJD3 também está associada à sinalização por STAT1, STAT3 e STAT4. Przanowski e colaboradores (2014) utilizando culturas de micróglias primárias ativadas por LPS e ensaios de imunoprecipitação demonstraram que STAT1 e STAT3 estimulam a transcrição do gene JMJD3 através da ligação ao seu promotor. O silenciamento do gene JMJD3 inibiu a expressão de genes dependentes de STAT. Adicionalmente, o silenciamento simultâneo desses três genes (JMJD3, STAT1 e STAT3) promoveu uma inibição ainda mais pronunciada de genes inflamatórios em células de micróglias (PRZANOWSKI et al., 2014) (Figura 3①). Posteriormente, Pham e colaboradores (2013) descreveram a associação de JMJD3 a STAT4 na ativação de genes que regulam a diferenciação da resposta Th1, sendo possível observar a diminuição da marca H3K27me3 nos promotores dos genes afetados (Figura 3②) (por exemplo, JMJD3 controlando a transcrição gênica induzida por IL-12 dependente de STAT4 (PHAM et

al., 2013). Estas observações indicam que o JMJD3 tem um papel crucial na diferenciação Th1 induzida por STAT4 e em algumas doenças com perfil inflamatório.

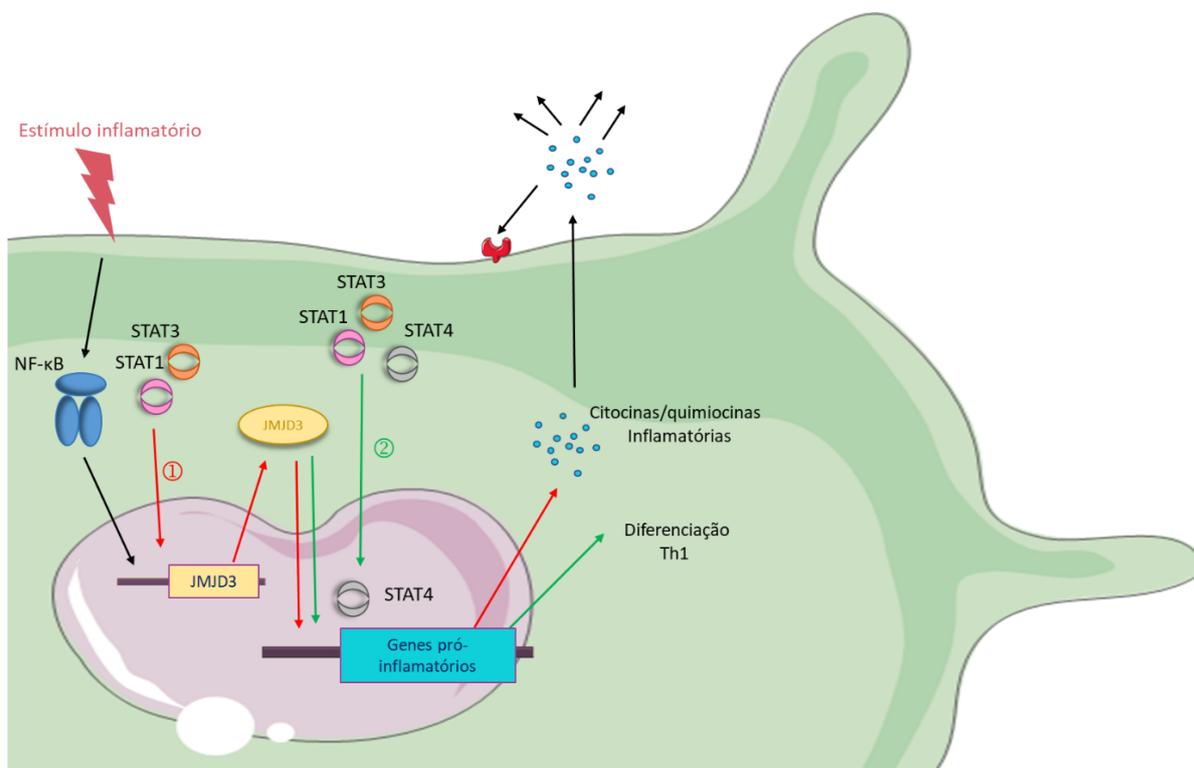


Figura 3. Resumo da regulação da enzima JMJD3 via NF-κB e expressão de genes pró-inflamatórios. Estímulos inflamatórios levam a ativação de NF-κB e produção de citocinas. As citocinas liberadas levam à fosforilação de Stat1 e Stat3. ① A ativação de NF-κB, Stat1 e Stat3 leva à expressão de JMJD3. ② Stat1, Stat3 e Stat4 associados à JMJD3 direcionam a expressão de genes pró-inflamatórios. Fonte: adaptado de (PHAM et al., 2013; PRZANOWSKI et al., 2014).

2.4. GSK-J4

O GSK-J4 é um composto inibidor seletivo das histonas demetilases JMJD3 e UTX de mamíferos. O composto foi desenvolvido como uma estratégia de pró-fármaco, uma vez que a formulação inicial, o GSK-J1, possui como radical um ácido propanoico, que confere à molécula baixa permeabilidade celular (Figura 4). A fim de torná-lo uma droga mais permeável, foi adicionado um grupo éster que mascara a alta polaridade dos grupos ácidos, de forma que, GSK-J4 tem seu grupo éster rapidamente hidrolisado por esterases celulares, gerando concentrações intracelulares mais elevadas do composto ativo GSK-J1. O mecanismo de inibição do composto GSK-J4 ocorre pela ocupação do sítio de ligação do cofator (alfa-cetoglutarato) das enzimas JMJD3/UTX, o que bloqueia sua atividade de demetilase,

permitindo a ligação do PRC1 e o silenciamento de genes regulados por este complexo (Figura 5) (KRUIDENIER et al., 2012).

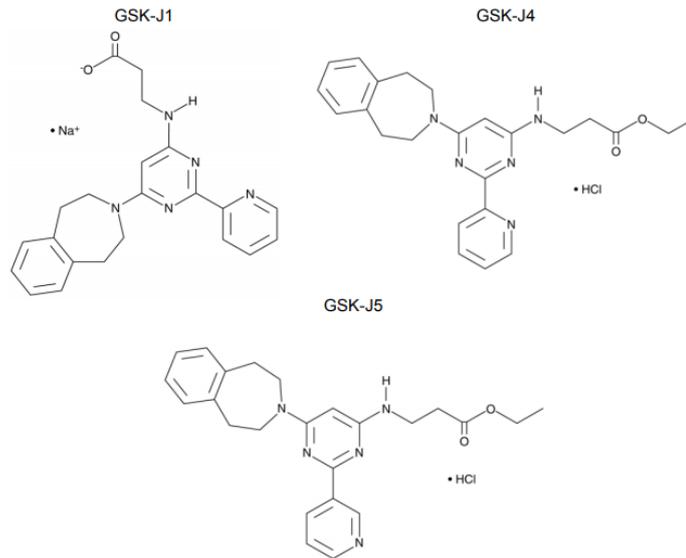


Figura 4. Estrutura química do composto GSK-J1, do pró-fármaco GSK-J4 e o seu isômero inativo GSK-J5. A estrutura do composto GSK-J1, pouco permeável em células de mamífero devido aos seus grupos ácidos, e seu respectivo pró-fármaco, GSK-J4, com um grupo éster etílico em sua estrutura. Fonte: adaptado de (KRUIDENIER et al., 2012).

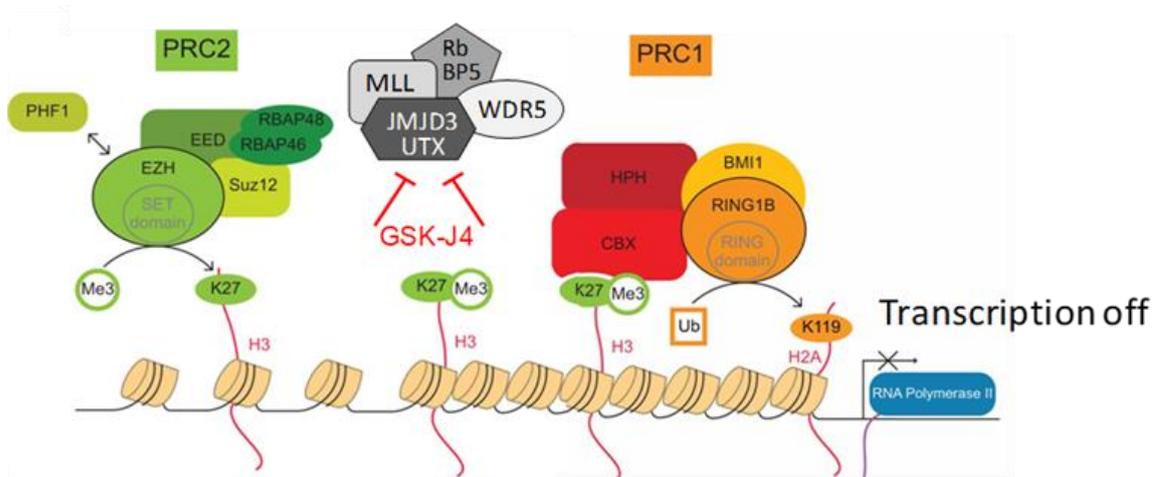


Figura 5. Efeito de GSK-J4 sob a demetilase JMJD3. Ação do GSK-J4 inibindo as demetilases (JMJD3 e UTX) e favorecendo o silenciamento da expressão gênica. Fonte: adaptado de (YOO; HENNIGHAUSEN, 2011).

Em 2012, a atividade farmacológica de GSK-J4 foi inicialmente caracterizada em um modelo de resposta inflamatória onde macrófagos humanos estimulados com LPS ou derivados de pacientes com Artrite Reumatoide foram tratados com o composto. A exposição de GSK-J4 *in vitro* reduziu a expressão de 16 de 34 citocinas induzidas por LPS, incluindo TNF- α (KRUIDENIER et al., 2012). O potencial anti-inflamatório do composto também foi explorado em modelos murinos de Encefalomielite Autoimune (EAE) (DOÑAS et al., 2016) e Sepsis (PAN et al., 2018). O composto também foi caracterizado por sua atividade anti-tumorogênica contra Leucemia Linfoblástica Aguda de Células T (T-ALL) (NTZIACHRISTOS et al., 2014) e Glioma Pontino Difuso Intrínseco (DIPG) (GRASSO et al., 2015; HASHIZUME et al., 2014). GSK-J4 foi estudado em modelo murino de Diabetes Tipo 2 por apresentar funções regulatórias e reduzir níveis de IL-12 em macrófagos estimulados com LPS e IFN- γ (GALLAGHER et al., 2015). As concentrações, as vias de administração e os principais trabalhos utilizando GSK-J4 estão resumidos na Tabela 1.

Os efeitos *in vitro* do GSK-J4 reforçam seu efeito anti-inflamatório na transcrição de citocinas importantes para resposta Th1, como TNF- α , IFN- γ e IL-12, reforçando seu potencial no papel para intervenção quimioterápica de doenças com caráter inflamatório.

Tabela 1. Resumo das propriedades farmacológicas de GSK-J4 utilizadas *in vitro* na literatura.

Modelo	Linhagem celular / Modelo animal	Alvo	Concentração / Dose (via)
Artrite Reumatoide ¹	Macrófago humano	TNF- α	9 μ M*
T-ALL ²	CUTLL1	Crescimento celular	2 μ M*
DIPG ³	Células de tumor/ Camundongo BALB/C	Mutação K27M	1,3 – 3 μ M*/ 100 mg/kg (IP)
Diabete Tipo 2 ⁴	Macrófago murino	IL-12	10 μ M
EAE ⁵	DC / C57BL/6	IL-6, IFN- γ e TNF- α	25 nM / 0,5 mg/kg (IP)
Sepse ⁶	Raw264.7/ Camundongo ICR	MCP-1, CCL-5, IFN- β , IL-6 e TNF- α	4 μ M / 3 mg/kg (IP)

Símbolos: (*) CI₅₀.

Abreviações: CI₅₀, concentração inibitória de 50%; IP, intraperitoneal; DC, célula dendrítica; DIPG, Glioma Pontino Difuso Intrínseco; EAE, Encefalomielite Autoimune; T-ALL, Leucemia Linfoblástica Aguda de Células T. Referências: ¹(KRUIDENIER et al., 2012), ²(NTZIACHRISTOS et al., 2014), ³(GRASSO et al., 2015; HASHIZUME et al., 2014), ⁴(GALLAGHER et al., 2015), ⁵(DOÑAS et al., 2016), ⁶(PAN et al., 2018).

3 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A resposta inflamatória exagerada e ineficaz de indivíduos com Leishmaniose Cutânea possui um importante papel no dano tecidual e, conseqüentemente, no aumento do tempo de cura e mesmo na falha terapêutica. Assim sendo, a associação de drogas imunomoduladoras à tratamentos com drogas leishmanicida pode auxiliar na diminuição da inflamação e do dano tecidual.

A regulação de citocinas inflamatórias a nível transcricional é um dos mecanismos chave na etiologia de muitas doenças inflamatórias. A eficácia dos inibidores de histona demetilases em regular a resposta inflamatória abre novas possibilidades para desenvolvimento de terapias que modulam de forma específica a transcrição de genes pro-inflamatórios. Explorar esse racional em casos de LC seria interessante, uma vez que já se sabe que o intenso processo inflamatório permanece ativo mesmo após a diminuição da carga parasitária em infecções causadas por *L. (V.) braziliensis*, prolongando o período para a cura e contribuindo para o estigma social associado ao aspecto das lesões.

Neste sentido, a hipótese deste trabalho é que GSK-J4 possui efeito leishmanicida e modula a resposta pró-inflamatória de macrófagos infectados por *Leishmania (V.) braziliensis* *in vitro* e pode contribuir para redução dos danos teciduais característicos do modelo experimental de Leishmaniose Cutânea em murinos.

4 OBJETIVOS

4.1. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial quimioterápico de GSK-J4 e os potenciais mecanismos envolvidos na morte da *Leishmania (V.) braziliensis* no modelo murino de Leishmaniose Cutânea.

4.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar o efeito leishmanicida do GSK-J4 sobre as formas evolutivas de *L. (V.) braziliensis*;
- Identificar *in silico* possíveis alvos do composto no genoma de *Leishmania (V.) braziliensis*;
- Avaliar a viabilidade de macrófagos murinos expostos ao GSK-J4;
- Investigar a produção de espécies reativas de oxigênio e óxido nítrico em culturas de macrófagos infectados após exposição ao composto;
- Avaliar o perfil inflamatório de culturas de macrófagos infectados após exposição ao composto;
- Avaliar o tratamento *in vivo* com administração intralesional do GSK-J4 no modelo de Leishmaniose Cutânea causado por *Leishmania (V.) braziliensis*.

5 MATERIAIS E METÓDOS

5.1. COMPOSTOS

Inicialmente, GSK-J4 e seu isômero inativo (GSK-J5) foram doados por Dra. Susanne M. Knapp (Universidade de Oxford e Consórcio SCG). Posteriormente, os compostos foram adquiridos da Sigma e Tocris, respectivamente. Os estoques foram feitos a 10 mM em DMSO 100% e as diluições foram realizadas em meio RPMI ou Schneider.

5.2. CULTIVO DOS PARASITOS

A linhagem de *L. (V.) braziliensis* (MHOM/BR/01/BA788) foi mantida em cultura *in vitro* como promastigotas proliferativos em meio Schneider suplementado com 10% (v/v) de SFB, 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina em estufa incubadora B.O.D. (Biochemical Oxygen Demand) a 27 °C (SANTOS et al., 2014). As formas promastigotas foram mantidas em meio de cultura por 7 passagens, com cerca de 7 dias cada, sendo assim necessário a realização de um novo isolamento das formas amastigotas dos parasitos a partir de modelo animal.

5.3. ENSAIO DE VIABILIDADE DA FORMA PROMASTIGOTA

Uma cultura de promastigotas na fase exponencial de crescimento foi centrifugada a 88 x g por 4 minutos a 4°C e o pellet descartado a fim de eliminar parasitos mortos. O sobrenadante foi diluído para uma concentração de 5×10^5 parasitos por mL. Na placa de 96 poços de fundo U, seguiu-se uma incubação de 24 horas em triplicatas com GSK-J4 nas concentrações de 30 µM; 7,5 – 0,0073 µM, e com o GSK-J5 (isômero inativo do GSK-J4) na concentração de 7,5 µM. Para o controle negativo de citotoxicidade foi utilizado apenas o meio Schneider suplementado. A placa foi centrifugada a 1.620 x g por 10 minutos a 4°C. Os poços foram lavados com tampão fosfato salino (PBS) 1x e centrifugados novamente. O marcador de viabilidade celular *Fixable Viability Dye* eFluor® 506 (Thermo Fisher Scientific) foi utilizado como fluoróforo de acordo com as instruções do fabricante para discriminar os parasitos mortos dos vivos. A incubação com o fluoróforo em PBS 1x durou 30 minutos e a placa foi novamente centrifugada para a etapa de fixação com paraformaldeído a 4% (v/v) para aquisição no Citômetro de Fluxo BD LSRFortessa™. A análise dos dados obtidos foi realizada com o

programa FlowJo V10 e a concentração inibitória de 50% (CI₅₀) foi calculado utilizando o programa GraphPad Prism 5.02.

5.4. AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA DE PROMASTIGOTAS EXPOSTOS AO GSK-J4

Para a análise morfológica dos promastigotas após exposição ao composto foi realizado Microscopia Eletrônica de Varredura. Culturas em triplicatas de *Leishmania (V.) braziliensis* em fase Log foram centrifugadas a 1.620 x g por 10 minutos a 4°C com o objetivo de eliminar possíveis parasitos mortos na cultura. As culturas foram expostas 888 nM de GSK-J4 e 888 nM de GSK-J5 por 24 horas em estufa incubadora B.O.D. a 27 °C. Culturas controle não foram expostas aos compostos. As culturas foram lavadas em PBS 1x e fixadas em solução Karnovsky contendo 2% de glutaraldeído a 70%, 4% de paraformaldeído e tampão Cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7, por 2 horas a temperatura ambiente. Após a fixação, as células foram lavadas três vezes em Tampão Cacodilato 0,1 M e posteriormente pós-fixadas em solução contendo tetróxido de ósmio a 1% em tampão cacodilato 0,1 M, pH 7,4, por 1 hora a temperatura ambiente e protegido da luz. As células foram lavadas novamente com o tampão cacodilato por três vezes. As amostras foram aderidas em lamínulas tratadas com poli-L-lisina a 0,1% e desidratadas em série com álcool a 30%, 50%, 70%, 90% e três vezes em álcool 100%. As amostras foram secas no equipamento Ponto Crítico Leica CPD 030. A montagem nos “Stubs” foi realizada com a superfície da lamínula aderida com a amostras volta para cima e a fita de carbono abaixo. Posteriormente as amostras foram metalizadas com ouro e observadas com o Microscópio Eletrônico de Varredura JEOL 6390 LV. Estes experimentos foram realizados em colaboração com a Plataforma Técnica de Microscopia do IGM-Fiocruz.

5.5. ANÁLISES *IN SILICO*

A fim de identificar possíveis alvos do composto no genoma do parasito, realizamos uma busca sistemática do genoma de *L. (V.) braziliensis* utilizando PSI-BLAST (Position-Specific Iterated BLAST), utilizando como requisito a presença de um domínio JmjC com E-value de $1,0 \times 10^{-7}$. As primeiras buscas interativas foram realizadas utilizando representantes de proteínas JmjC de *Schizosaccharomyces pombe*, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster* e *Homo sapiens* (KLOSE; KALLIN; ZHANG, 2006). A partir das sequências identificadas, foi realizado um alinhamento de proteínas com domínio JmjC em *Leishmania* e outros organismos utilizando o programa ClustalX, seguido de alinhamentos e

análises dos domínios JmjC. Os domínios proteicos JmjC encontrados no genoma de *Leishmania (V.) braziliensis* foram analisados utilizando a ferramenta SMART - Simple Modular Architecture Research Tool (<http://smart.embl-heidelberg.de/>).

5.6. SEPARAÇÃO E CULTURA DE MACRÓFAGOS DE MEDULA

Macrófagos murinos foram obtidos a partir de lavados internos da medula óssea de camundongos BALB/C (ISHII et al., 2008). Todos os protocolos de experimentação utilizados para obtenção das células desse ensaio foram aprovados pelo CEUA da instituição (protocolo 021/2017). Após a eutanásia dos animais, fêmures e tíbias foram retirados e suas epífises ósseas seccionadas. Com auxílio de uma agulha de 32G nas extremidades ósseas, o interior dos ossos foi lavado com meio RPMI-1640 suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina e 2 mM de L-glutamina. Este meio também foi suplementado com 30% (v/v) de sobrenadante de cultura de células L929 como fonte de M-CSF. O lavado de células foi incubado durante 7 dias em placas de Petri (3 placas por animal), contendo 10 mL de meio cada, a 37°C com 5% de CO₂ para diferenciação dos monócitos em macrófagos. Para os ensaios *in vitro*, os macrófagos foram desaderidos das placas de Petri utilizando 1 mL de uma solução de RPMI-1640 a 0,25% (p/v) de tripsina e 1 mM EDTA por 5 minutos a temperatura ambiente. Logo após o período de incubação com tripsina, foi adicionado 1 mL de RPMI suplementado para interromper a ação da enzima. O volume foi centrifugado a 405 x g por 10 min a 4°C, lavado com solução salina 0,9% e centrifugado novamente. As células foram ressuspensas em RPMI suplementado na densidade celular final necessária para cada ensaio e plaqueados em placas de cultura celular. As placas foram incubadas por 24 horas a 37°C com 5% de CO₂ para adesão das células aos poços.

5.7. INFECÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS

Os macrófagos murinos aderidos aos poços foram infectados com formas promastigotas metacíclicas de *L. (V.) braziliensis* na proporção final de 10:1 (parasitos por célula) em meio RPMI suplementado. A placa foi incubada por 2 horas a temperatura ambiente e posteriormente incubada por 22 horas a 37°C com 5% de CO₂. Após esse período, os poços foram lavados com salina três vezes para remoção de parasitos não internalizados (SANTOS et al., 2014).

5.8. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DO GSK-J4 CONTRA AMASTIGOTAS INTRACELULARES

Os macrófagos murinos infectados na densidade celular de 10^6 por poço em placa de 24 poços foram expostos por 24 horas em triplicatas ao GSK-J4 nas concentrações de 30 μM ; 22,5 μM ; 15 μM ; 11,25 μM ; 7,5 μM ; 5,82 μM e 3,75 μM . Em paralelo, foi realizado um ensaio para avaliar o efeito em 48 horas utilizando 7,5 μM e 3,75 μM de GSK-J4. As incubações foram realizadas a 37°C na incubadora de CO₂. Após a incubação, o sobrenadante da cultura foi retirado e os poços foram lavados 3 vezes com salina. As células foram fixadas com metanol e coradas com Hematoxilina e Eosina. A taxa de macrófagos infectados e a quantidade de amastigotas por macrófagos foram determinadas pelo método de contagem direta (em 200 ou 100 células) em microscópio óptico em campo claro em aumento de 100x (FERNANDES et al., 2016). Visando avaliar se a redução da carga parasitária se devia ao estresse e morte dos macrófagos infectados e tratados com o composto GSK-J4, calculamos ainda a densidade de macrófagos no grupo controle e nos diferentes tratamentos. Quatro campos aleatórios da lamínula foram fotografados e todas as células contadas no microscópio de ótico em aumento de 100x. Os dados foram plotados e a CI₅₀ do composto para os amastigotas foi calculada utilizando o programa GraphPad Prism 5.02.

5.9. VIABILIDADE INTRACELULAR DE AMASTIGOTAS APÓS EXPOSIÇÃO AO COMPOSTO

Macrófagos infectados com densidade celular de 3×10^5 por poço em uma placa de 96 poços foram expostos em triplicatas à 7,5 μM ; 4,5 μM ; 2,25 μM e 1,12 μM de GSK-J4 em RPMI suplementado por 24 horas em estufa incubadora a 37°C com 5% de CO₂. Também foi acrescentado um ponto sem tratamento e outro com 7,5 μM do isômero inativo do composto, GSK-J5. Após tratamento, o meio foi retirado, os poços foram lavados três vezes com PBS 1x e o meio foi substituído por Schneider suplementado para o cultivo de promastigotas. A placa permaneceu por 8 dias em estufa incubadora B.O.D. a 27 °C (KHOURI et al., 2009). Esse tempo é suficiente para que haja lise das células, liberação e multiplicação celular dos parasitos na forma promastigota. A análise da presença de promastigotas livres foi realizada por contagem direta na câmara de Neubauer no microscópio ótico em campo claro. O resultado foi representado pela quantidade de parasitos livres em cada concentração. Os dados foram plotados e as análises estatísticas realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5.02

5.10. ENSAIO DE VIABILIDADE EM MACRÓFAGOS

Neste ensaio foi utilizado a densidade celular de 3×10^5 macrófagos por poço em triplicatas em placa de 96 poços. Foram utilizadas concentrações crescentes de GSK-J4 (10 – 150 μM). Como controle negativo de viabilidade celular foi utilizado peróxido de hidrogênio (H_2O_2). Para o controle positivo de viabilidade foi utilizado apenas o meio RPMI suplementado. Após 24 horas de incubação com GSK-J4, acrescentou-se 10% (v/v) de Alamar Blue® (Invitrogen™) (CRONEMBERGER-ANDRADE et al., 2014). A placa foi mantida nas mesmas condições por 4 horas. O ensaio consiste na detecção da absorbância do meio, uma vez que células viáveis são capazes de reduzir a resazurina presente no reagente, um composto de cor azul. As células viáveis reduzem de forma contínua a resazurina, tornando a cor do meio rosa e alterando sua absorbância. A densidade ótica das reações foi lida no espectrofotômetro nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm. Os dados de redução de resazurina presente no Alamar Blue® foram analisados e plotados utilizando o programa GraphPad Prism 5.02 e expressos em micromolar.

5.11. DOSAGEM DE CITOCINAS/QUIMIOCINAS INFLAMATÓRIAS

Em uma placa de 24 poços, macrófagos infectados ou não foram plaqueados na densidade celular de 10^6 por poço. As culturas foram expostas em quadruplicata ao GSK-J4 nas concentrações 15 μM , 7,5 μM e 4,5 μM , e ao GSK-J5 15 μM por 24 horas. O estímulo com 40 ng/mL de LPS foi utilizado como controle positivo da resposta inflamatória. Após 24 horas de tratamento, o sobrenadante foi coletado para o ensaio seguindo as instruções do fornecedor dos kits. Neste ensaio foram utilizados os kits de citocinas inflamatórias e Th1/Th2/Th17 para camundongo (Cytometric Beads Array – CBA, BD™). A leitura dos tubos foi realizada no Citômetro de Fluxo BD LSRFortessa™. A análise dos dados obtidos foi realizada com o programa FlowJo V10 e as análises estatísticas utilizando o programa GraphPad Prism 5.02.

5.12. DOSAGEM INDIRETA DE ESPÉCIES REATIVAS DE OXIGÊNIO E ÓXIDO NÍTRICO

Macrófagos infectados ou não na densidade celular final de 3×10^5 por poço foram aderidos numa placa de 96 poços. Durante o plaqueamento das células e exposição ao composto, as células foram estimuladas com 10 ng/mL de $\text{IFN-}\gamma$. As culturas foram expostas em quadruplicatas ao GSK-J4 nas concentrações de 15 μM , 7,5 μM e 4,5 μM , e ao GSK-J5 15 μM por 24 horas. Como controle positivo foi utilizado 40 ng/mL de LPS. A dosagem de óxido

nítrico foi realizada de forma indireta a partir da detecção de um dos produtos estáveis da síntese de NO presente no sobrenadante da cultura celular, o nitrito (NO_2^-). Para isso incubou-se alíquotas de 50 μL dos sobrenadantes de cada tratamento com 25 μL de cada um dos dois reagentes de Griess. Um dos reagentes é sulfanilamida 1% (p/v) e o outro reagente consiste em N-1-naphtylethtylenodiamina, ambos diluídos em solução de H_3PO_4 a 2,5% (v/v). A produção de superóxido foi dosada em paralelo, de forma similar, porém com a adição de 0,5 mM de hidroxilamina ao meio de cultura durante o tratamento com GSK-J4. A hidroxilamina converte superóxido em nitrito e dessa forma pode ser quantificada utilizando-se o reagente de Griess (KHOURI et al., 2010). As absorvâncias foram detectadas por um leitor de microplacas SPECTRA Max 190, usando filtros de 550 e 620 nm. As concentrações de nitrito foram determinadas a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (200 – 0,8 μM). Os dados foram plotados e as análises estatísticas realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5.02. Os resultados foram expressos em concentração μM de NO_2^- .

5.13. TRATAMENTO INTRALESIONAL DE CAMUNDONGOS BALB/C INFECTADOS COM *L. (V.) BRAZILIENSIS* COM GSK-J4

Para o ensaio *in vivo* preliminar foram utilizados 18 camundongos fêmeas (*Mus musculus*) da linhagem BALB/C com 6 a 8 semanas de idade, provenientes do Biotério do Instituto Gonçalo Moniz – Fiocruz. Todos os protocolos de experimentação animal desses ensaios foram aprovados pelo CEUA da instituição (protocolo 017/2016). Os camundongos foram inoculados com auxílio de agulha de 27,5G, na orelha esquerda, com promastigotas em fase estacionária de *L. (V.) braziliensis* (10^5 parasitos em 10 μL de salina) (DE MOURA et al., 2005). As espessuras das orelhas foram medidas semanalmente com o auxílio de um paquímetro desde a infecção até a eutanásia dos animais para acompanhamento do desenvolvimento das lesões. Após a terceira semana de infecção, os camundongos foram separados em três grupos ($n = 6$) para início dos tratamentos. No primeiro ensaio, os camundongos foram separados nos grupos Controle, DMSO e GSK-J4. O grupo Controle recebeu apenas 10 μL de salina como tratamento. O grupo DMSO foi tratado com 0,04% (v/v) de DMSO em 10 μL de salina, o que corresponde a concentração do veículo na qual o composto foi diluído. O grupo GSK-J4 foi tratado com 4,5 μM do composto diluído em 10 μL de salina contendo 0,04% (v/v) de DMSO. Foram administradas 5 doses com intervalo de 2 dias entre cada administração. No segundo ensaio, os camundongos foram separados nos grupos DMSO, 50 μM GSK-J4 e 100 μM GSK-J4. O grupo DMSO foi tratado com 0,44% (v/v) de DMSO em 10 μL de salina, o que corresponde a

concentração do veículo na qual o composto foi diluído. O segundo grupo foi tratado com 50 μM de GSK-J4 diluído em 10 μL de salina contendo 0,44% (v/v) de DMSO (Grupo 50 μM). O terceiro grupo foi tratado com 100 μM de GSK-J4 diluído em 10 μL de salina contendo 0,88% (v/v) de DMSO (Grupo 100 μM). Foram administradas 3 doses com intervalo de 1 dia entre cada administração. Os tratamentos foram realizados por via intralesional na margem da lesão com seringas de insulina para baixa dose (3/10 mL BD Lo-Dose™ Insulin Syringe com agulha permanente anexada, U-100) conforme descrito por (EDDAIKRA et al., 2016). Ao fim da 11ª semana após a infecção, os animais foram eutanasiados com 240 mg/kg de Tiopental intraperitoneal. As orelhas foram removidas para ensaios de diluição limitante.

5.14. QUANTIFICAÇÃO DE PARASITOS POR DILUIÇÃO LIMITANTE

Os ensaios de diluição limitante foram realizados como descrito por (TITUS et al., 1985). Os folhetos das orelhas foram separados com pinças cirúrgicas e incubados em RPMI não suplementado contendo 0,2 mg/mL de liberase por 2 horas a 37°C com 5% de CO₂. Após incubação, as orelhas foram maceradas individualmente com o auxílio de um macerador, peneiradas em um tubo Falcon e centrifugadas a 1620 x g por 10min a 4°C. As células foram ressuspendidas em 1mL de RPMI suplementado e desse volume foi retirado uma alíquota de 20 μl para diluições seriadas em 180 μl de Schneider suplementado na placa de 96 poços. As placas foram incubadas na B.O.D por 14 dias a 25°C. O resultado foi representado pela quantidade de parasitos livres em cada ponto de tratamento. As análises estatísticas realizadas utilizando o programa GraphPad Prism 5.02.

5.15. ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Os resultados foram apresentados como a média \pm desvio padrão das médias dos experimentos. Os gráficos dos ensaios são representativos de três ou duas repetições. A distribuição normal dos dados foi determinada pelo teste de normalidade de D'Agostino–Pearson. A significância das diferenças nos resultados foi estimada pelo teste de ANOVA e a probabilidade das diferenças entre os resultados observados em diferentes grupos serem devido ao acaso foi avaliada pelo teste de Tukey. Os dados foram analisados utilizando o programa Prisma V6 (GraphPad Software, Intuitive Software for Science, San Diego, CA) ou Flowjo V10 (FlowJo software, Tree Star, Inc., Ashland, OR, USA). Diferenças estatísticas foram consideradas para $P < 0,05$.

6 RESULTADOS

6.1. GSK-J4 APRESENTA ATIVIDADE LEISHMANICIDA CONTRA PROMASTIGOTAS DE *L. (V.) BRAZILIENSIS*

Inicialmente, investigamos o efeito do GSK-J4 sobre a forma promastigota de *L. (V.) braziliensis*. A ação leishmanicida foi avaliada por Citometria de Fluxo com auxílio do marcador de viabilidade celular *Fixable Viability Dye eFluor® 506* após a exposição da cultura dos parasitos às concentrações crescentes do composto em um período de 24 horas. A curva de viabilidade dos promastigotas após a incubação com 7,3 nM - 30 µM de GSK-J4 pode ser observada nas Figuras 6A e B. O composto apresentou atividade tóxica ao parasito a partir de 234,4 nM e atingiu 99,6% de efeito leishmanicida em 7,5 µM na cultura de *L. (V.) braziliensis*. O valor de CI_{50} para promastigotas expostos por 24 horas ao GSK-J4 foi estabelecido em $888 \pm 39,0$ nM. O composto apresentou efeito concentração dependente, enquanto o isômero inativo, GSK-J5, na concentração de 7,5 µM e não afetou a viabilidade dos promastigotas em comparação à cultura controle.

A ação do composto sobre a morfologia dos parasitos foi avaliada por Microscopia Eletrônica de Varredura após a exposição da cultura a concentração equivalente a CI_{50} (888 nM). Na Figura 6C é possível notar que os promastigotas tratados com GSK-J4 possuem morfologia arredondada. A cultura tratada com 888 nM do isômero inativo (GSK-J5) possui aspecto similar ao grupo livre de tratamento (controle). As imagens confirmam os dados de viabilidade celular (Figuras 6A e B) em relação ao efeito leishmanicida de GSK-J4 sob promastigotas e a ausência de efeito tóxico do isômero inativo sob os parasitos.

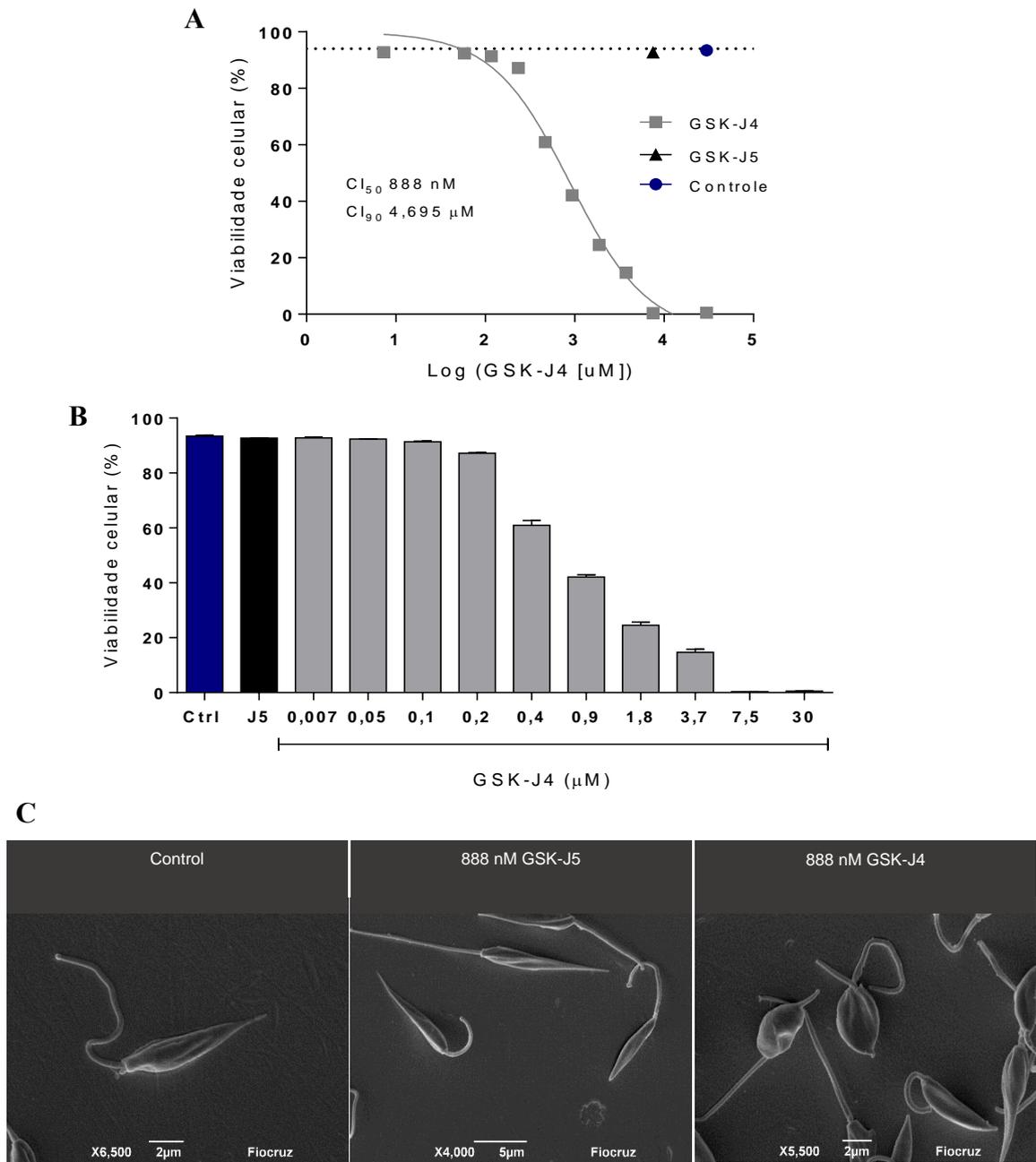
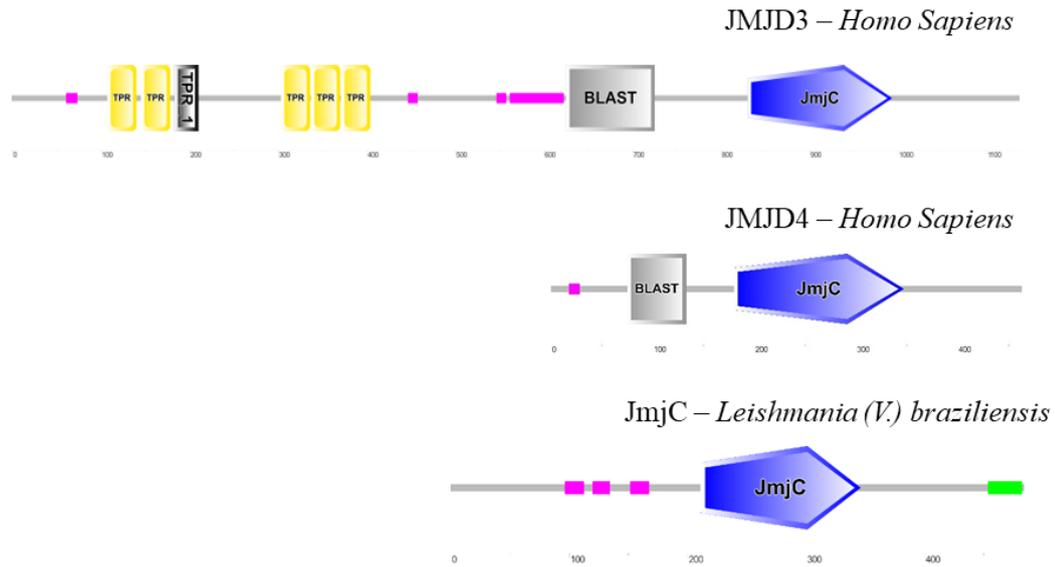


Figura 6. Efeito da exposição *in vitro* de promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* ao composto GSK-J4. (A) e (B) Culturas de promastigotas (5×10^5) foram expostas às concentrações crescentes de GSK-J4 (30 μM ; 7,5 μM ; 3,75 μM ; 1,87 μM ; 937,5 nM; 468,8 nM; 234,4 nM; 117,2 nM; 58,6 nM e 7,3 nM) e GSK-J5 7,5 μM por 24 horas. Promastigotas viáveis foram quantificados com auxílio do marcador de viabilidade celular *Fixable Viability Dye eFluor® 506* por Citometria de Fluxo. (C) Microscopia eletrônica de varredura da forma promastigota de *L.(V) braziliensis* após exposição à 888 nM (CI_{50}) de GSK-J4 e 888 nM de GSK-J5 por 24 h. Resultados analisados em forma de regressão não-linear para o modelo de concentração-resposta. Dados expressos como as médias de triplicatas. Resultados representativos de dois experimentos independentes.

6.2. *LEISHMANIA (V.) BRAZILIENSIS* NÃO APRESENTA ORTÓLOGOS DA ENZIMA JMJD3 EM SEU GENOMA

A existência de histona demetilases já é bem descrita em humanos, incluindo a JMJD3. Em contrapartida, ainda não foram identificados genes de histonas demetilases em *Leishmania* (IVENS et al., 2005). A fim de identificar potenciais histonas demetilases no genoma de *L. (V.) braziliensis*, utilizamos sequências de proteínas contendo domínio JmjC de organismos modelos (*Schizosaccharomyces pombe*, *Caenorhabditis elegans*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Drosophila melanogaster* e *Homo sapiens*). Essas buscas permitiram a identificação de 5 sequências contendo domínios JmjC no genoma de *L. (V.) braziliensis* (A4HMW1, A4HIZ9, A4HEY4, A4HFP0 e A4HFQ9) (dados não apresentados). A sequência com maior *score* de similaridade a um membro da família Jumonji (JMJD4 - Uniprot Q9H9V9) já caracterizada foi a A4HFP0 (Figure 7A). Entretanto, analisando o alinhamento realizado, não é possível observar extensas regiões conservadas entre *L. (V.) braziliensis* e a proteína JMJD4 humana, de forma que não é possível afirmar que esta sequência pertence a uma histona demetilase em *Leishmania*.

A



B

```

*          20          *          40          *          60          *          80
A4HFP0 LB: MLELDGTTLTLYEVRDACLRPNRPATIRNACRDSGICFDLAALKRRLCERELCRSLGSRATVPVYVPVFSTVQVASYDS : 80
JMJD4_HS : -MRAGPEEQALAGQKRGALRLLVPRILVLTVSAFA-----EVRRRVLRREVLSWMDRETRALADSHFRGLGVDVPGVGQ : 71
          6          4 LR P 66          A          4R L P          3RAL          V V

*          100          *          120          *          140          *          160
A4HFP0 LB: TPAARVERLHEFPPTTVKDEEREDEEGCCKEVPLEVVLRSWATSASAAACSLSQPHVYLLRDLWHLQATLENTATTSITTA : 160
JMJD4_HS : AEG-RVAIVSEEGAFSADYDFVRGFLLPNLPVFSFAFTQGGGSRRRWVTPAGRPDFDHLIRTYGDDVVVPVANCGVQEYNS : 150
          P RV 6 EP          V          W 3          L4 5

*          180          *          200          *          220          *          240
A4HFP0 LB: SSTPSSQRSEYAKRRASGTHGDGLYRVPRFLGADWMDSEFCSRNVMSHDVHSRTSPADDTGTRAHMGFGDSESQYRFQVM : 240
JMJD4_HS : NPKHEMTLRDVIITYWKEYIQAG--YSSPR--GCIYKLDWHLCRDEFEVDVETLPEVYFSSDWLNEFDALVD-DYRFVYA : 225
          Y          I          Y PR G 56 5          P DV 3          D          DYRF Y

*          260          *          280          *          300          *          320
A4HFP0 LB: GFGVSWTEFHCDVFGTYSWSENVCGRKHMFFP-----TMAGNAYLHTHLLFLFFPSPDIEVLTGPELDTVWCHFGD : 311
JMJD4_HS : GPAGVSWSEFHADIIFRSFSWVNVCGRRKWLFPFGQEEALDRRHGNLPYDVTSPALCDTHLHFRNQLAGPPELITICEAGE : 305
          GP GSW3P H D6F 35SWS NVCG K W          GN          L T R          6 Q G

*          340          *          360          *          380          *          400
A4HFP0 LB: LVFVPAIEFYHQVHNISGEVLPFLVDEGVATEEVRRRDGAVMSFASAEVNAQLSALTVAINHNWCNAFNVGRMAAFLAD : 391
JMJD4_HS : MVFVFSQWHHQVHNLDLTIIS---LNHNWVNGFNLANMWRFLQELCAVQEVSEWRDMSPDVHHHCQVIMRSCSGINFEE : 382
          6VFVP 5 HQVHN6          61          6          V 263          1          6

*          420          *          440          *          460          *          480
A4HFP0 LB: ARQLSSHISTDILAVICDTHDPAVWRGCFADRMLHNGTNNWSEFASMNCFLDYCLARVDLGADVTDGTEPERNAADFLRRLR : 471
JMJD4_HS : FYHFLKVIIAEKRLLVIREAAA-----EDGAGLGFEEQAADFVGRITEVLIASIVAHEDFORVITSAFSPCKELLCQUREAV : 457
          6          L V6          2 6          5 6          L 6A D          T          2          2LR

*
A4HFP0 LB: VQVDEYARLFEE : 484
JMJD4_HS : DAAAP----- : 463
          A

```

Figura 7. Análise *in silico* de uma proteína contendo domínio JmjC em *Leishmania (V.) braziliensis*. (A) Domínios proteicos mapeados pelo SMART demonstrando a existência do domínio JmjC em *Leishmania (V.) braziliensis* (E-value 1,08 E-7) entre três regiões de baixa complexidade e um Coiled-coil, bem como nas proteínas humanas JMJD3 (Uniprot O15550, alvo do GSK-J4) e JMJD4 (Uniprot Q9H9V9). (B) Alinhamento das seqüências dos domínios JmjC da enzima JMJD4 (Uniprot Q9H9V9) e a proteína A4HFP0 identificada em *Leishmania (V.) braziliensis*. Sombreado preto representa resíduos conservados no alinhamento. Sombreado cinza claro representa grupos de propriedades físico-químicas conservados nas seqüências do alinhamento.

6.3. GSK-J4 APRESENTA ATIVIDADE LEISHMANICIDA CONTRA AMASTIGOTAS DE *L. (V.) BRAZILIENSIS*

Após avaliar o efeito tóxico de GSK-J4 sob a forma promastigota do parasito, foi avaliado *in vitro* o efeito do composto frente à forma amastigota de *L. (V.) braziliensis* após 24 horas de exposição a concentrações de 3,75 - 30 μM de GSK-J4 e após 48 horas de exposição a 7,5 μM e 3,75 μM de GSK-J4. A taxa de infecção média (número de macrófagos infectados) nos grupos controle (Ctrl) foi de ~60% (Figuras 8A e 8C). A menor concentração utilizada (3,75 μM) reduziu a taxa de infecção dos macrófagos em ~ 50% em 24 h (Fig. 8A), apresentando efeito mais pronunciado no número total de amastigotas por macrófagos com uma redução de ~84% (Fig. 8B). Em 48 h, essa concentração reduziu a taxa de infecção dos macrófagos em ~ 90% (Fig. 8C) e o número total de amastigotas por macrófagos em ~ 94% (Fig. 8D). A exposição da cultura à concentração de 7,5 μM reduziu a taxa de infecção em ~ 90% quando incubado por 24 h e em ~ 96% no período de 48 h (Fig. 8A e 8C). Em relação ao número total de amastigotas, a mesma concentração reduziu cerca de 97% e 98,5% dos parasitos intracelulares em 24 e 48 h, respectivamente (Figura 8B e 8D). Com base nesses resultados, a CI_{50} e CI_{90} de GSK-J4 em 24 horas para a forma amastigota de *L. (V.) braziliensis* foi calculado em 4,5 μM e 7,9 μM , respectivamente. Não foi possível calcular tais valores para o período de 48 horas, uma vez que só foram utilizadas duas concentrações. Porém, é perceptível a relação entre o tempo e o efeito do composto nos macrófagos infectados. Novamente, GSK-J4 apresentou um efeito dependente da concentração utilizada, indicando que a atividade antiparasitária em amastigotas também é diretamente proporcional ao aumento das concentrações testadas, bem como ao tempo de exposição.

Visando avaliar se a redução da carga parasitária se devia ao estresse e morte dos macrófagos infectados expostos ao GSK-J4, calculamos a densidade de macrófagos no grupo controle e nos diferentes tratamentos em 24 horas. Concluímos que não houve diferença significativa entre os tratamentos ($P < 0,05$) (Figura 8E). Adicionalmente, não observamos alterações morfológicas devido à estresse ou morte celular nos macrófagos infectados e tratados com 7,5 μM de GSK-J4 por 24 horas em relação ao controle não tratado (Figura 8F).

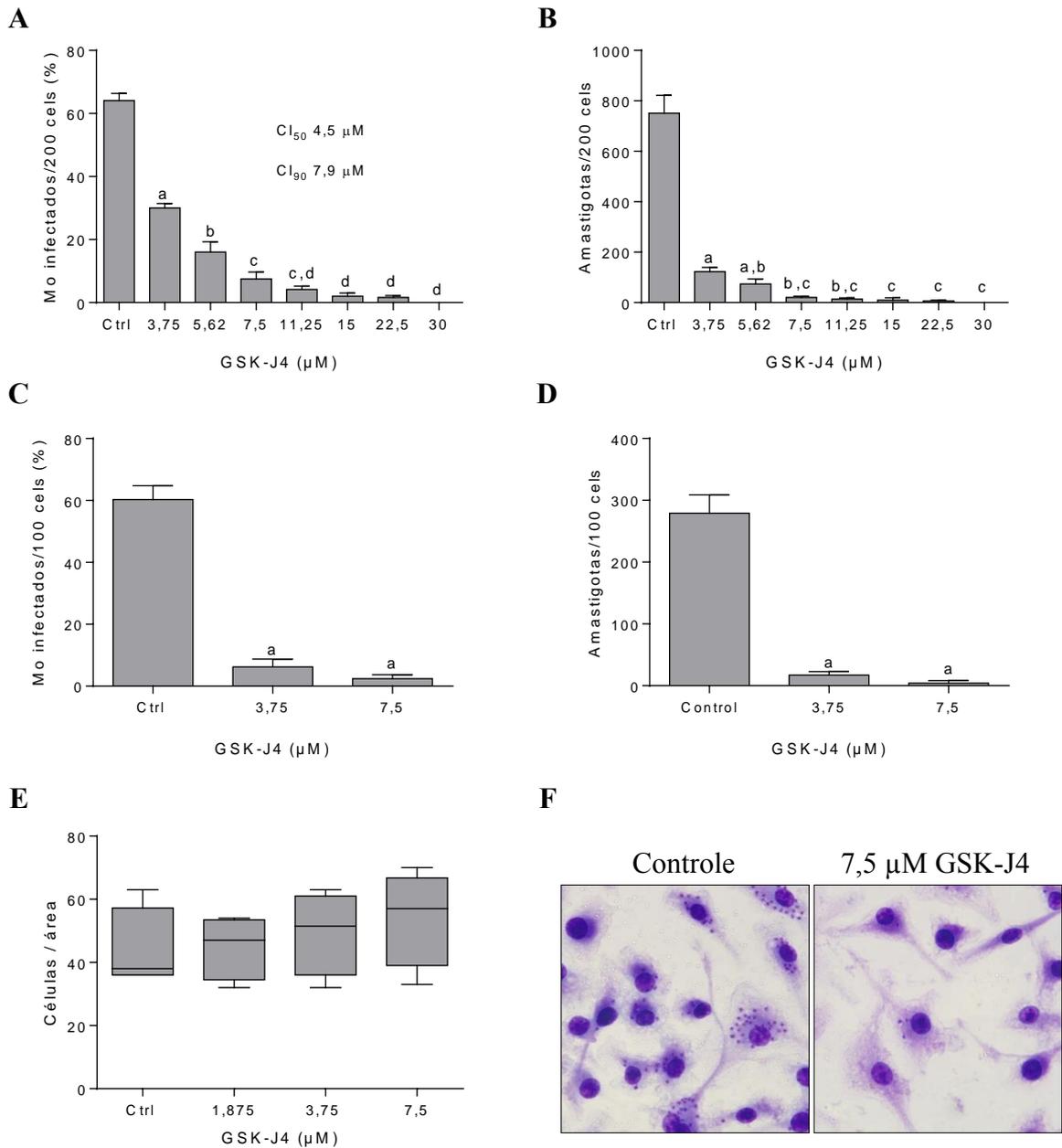


Figura 8. Efeito concentração-dependente de GSK-J4 *in vitro* em amastigotas de *L. (V.) braziliensis*. Macrófagos murinos (10^6) foram infectados (10:1) e expostos à 30 μM ; 22,5 μM ; 15 μM ; 11,25 μM ; 7,5 μM ; 5,62 μM e 3,75 μM de GSK-J4 por 24 h e 7,5 μM e 3,75 μM por 48 h. As lamínulas foram fixadas e coradas com HE, e analisadas por contagem direta em microscópio ótico em aumento de 100x. (A e C) Taxa de infecção e (B e D) quantidade de parasitos intracelulares em 24 h e 48 h, respectivamente. (E) Densidade celular avaliada em 24 h. (F) Macrófagos infectados expostos à 7,5 μM de GSK-J4 por 24 h e controle. Dados expressos como as médias ou medianas das triplicatas ou quadruplicatas \pm SD, One-Way ANOVA. Gráficos representativos de dois experimentos independentes.

6.4. GSK-J4 NÃO COMPROMETE A VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS MURINOS *IN VITRO*

Uma etapa importante na caracterização de drogas antiparasitárias é avaliar a viabilidade das células do hospedeiro após exposição ao composto. Culturas de macrófagos não infectados foram expostos às concentrações de 10 - 150 μM de GSK-J4 por 24 horas. A viabilidade celular foi avaliada pelo método de Alamar Blue. Como revela a Figura 9, a exposição das culturas até 50 μM de GSK-J4 não comprometeu a viabilidade dos macrófagos. A maior concentração utilizada (150 μM) reduziu em ~40% a viabilidade celular destes macrófagos. Desta forma não foi possível estabelecer a concentração citotóxica média (CC_{50}) de GSK-J4 em macrófagos murinos. Contudo, pode-se dizer que GSK-J4 possui índice de seletividade (IS) > 33,3.

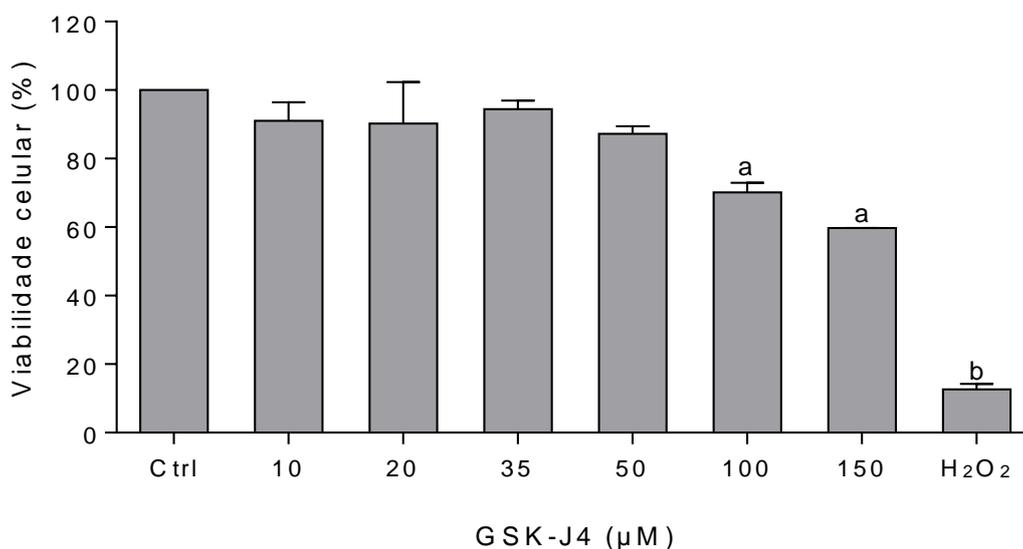


Figura 9. Ensaio de viabilidade celular em macrófagos murinos após exposição ao GSK-J4. Macrófagos murinos (2×10^5) não infectados foram expostos à 10 μM - 150 μM de GSK-J4 durante 24 horas. Peróxido de hidrogênio (H_2O_2) foi utilizado como controle de morte. As culturas foram avaliadas pela redução de resazurina como forma de avaliar a viabilidade celular. Valores expressos em termos percentuais como as médias das triplicatas \pm SD, One-Way ANOVA. Gráfico representativo de três experimentos independentes.

6.5. AMASTIGOTAS INTRACELULARES PERMANECEM INVIÁVEIS APÓS EXPOSIÇÃO A BAIXAS CONCENTRAÇÕES DE GSK-J4

O ensaio de viabilidade intracelular dos parasitos após exposição ao GSK-J4 foi realizado com o objetivo de avaliar a possibilidade de recuperação da infecção após a remoção do composto do meio de cultura. Para isso, culturas de macrófagos infectados foram expostos à 7,5 μM ; 4,5 μM ; 2,25 μM e 1,12 μM de GSK-J4; e 7,5 μM de GSK-J5 por 24 horas. Após esse período, o meio de cultura celular foi trocado por Schneider (meio de cultura para cultivo de promastigotas de *L. (V.) braziliensis*) livre de composto. As culturas foram mantidas por 8 dias para que ocorresse a lise espontânea das células e fosse possível quantificar parasitos viáveis nos grupos através da contagem dos promastigotas livres no meio de cultura. Como é possível notar nos dados da Figura 10, não foi possível quantificar promastigotas livres nas culturas expostas à 7,5 μM ; 4,5 μM e 2,25 μM GSK-J4, dessa forma GSK-J4 nessas concentrações reduziu em 100% a viabilidade dos parasitos intracelulares após 24 horas de exposição. A menor concentração utilizada (1,12 μM) reduziu em 98,8% a quantidade de promastigotas livres na cultura em relação ao controle. Estes resultados reforçam o efeito leishmanicida do GSK-J4 e sugerem que os parasitos observados nas Figuras 8A e B nas concentrações até 3,75 μM estão inviáveis e destinados à morte. Um resultado até certo ponto surpreendente foi que o isômero inativo (GSK-J5) na concentração de 7,5 μM reduziu em cerca de 24,5% o número de promastigotas livres no meio de cultura.

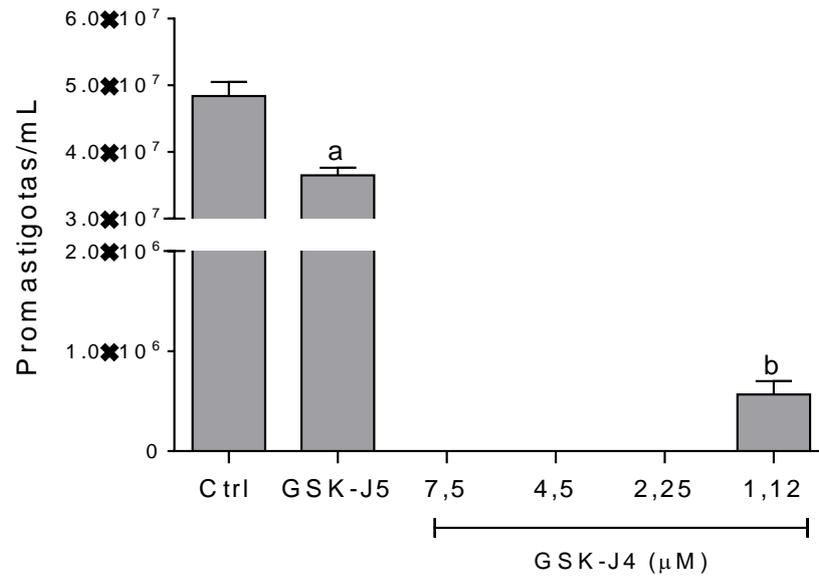


Figura 10. Viabilidade intracelular de *L. (V.) braziliensis* após exposição *in vitro* ao GSK-J4. Macrófagos murinos (2×10^5) infectados (10:1) foram expostos às concentrações de GSK-J4 (7,5 – 1,12 μM) e 7,5 μM de GSK-J5 por 24 horas. Em seguida a cultura foi mantida por 8 dias em Schneider livre de compostos. Promastigotas viáveis foram contadas de forma direta em Câmara de Neubauer em campo claro. Número de parasitos expresso como as médias das triplicatas \pm SD, One-Way ANOVA. Gráfico representativo de dois experimentos independentes.

6.6. GSK-J4 NÃO INDUZIU PRODUÇÃO DE EROS E NO EM MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS ATÉ 24 HORAS DE EXPOSIÇÃO AO COMPOSTO

Visando investigar o mecanismo de morte dos parasitos após o tratamento com GSK-J4, foram dosados indiretamente os níveis de óxido nítrico (nitrito) e superóxido (nitrito) no sobrenadante da cultura de macrófagos após 24 e 48 horas de exposição ao composto. As Figuras 11A e C revelam que não houve níveis significativos de superóxido após exposição das culturas à 4,5 μM , 7,5 μM e 15 μM GSK-J4 em 24 e 48 horas. Todavia, foram observadas diferenças significativas nos níveis de óxido nítrico nas culturas expostas à 7,5 μM e 15 μM de GSK-J4 por 48 horas (Figura 11D). Embora sem significância estatística, é possível notar em 24 horas diferenças nos níveis dosados de óxido nítrico nas culturas expostas ao GSK-J4 de forma dependente da concentração (Figura 11B). O isômero inativo do composto, GSK-J5 (15 μM), não estimulou a produção de superóxido e óxido nítrico nos tempos avaliados.

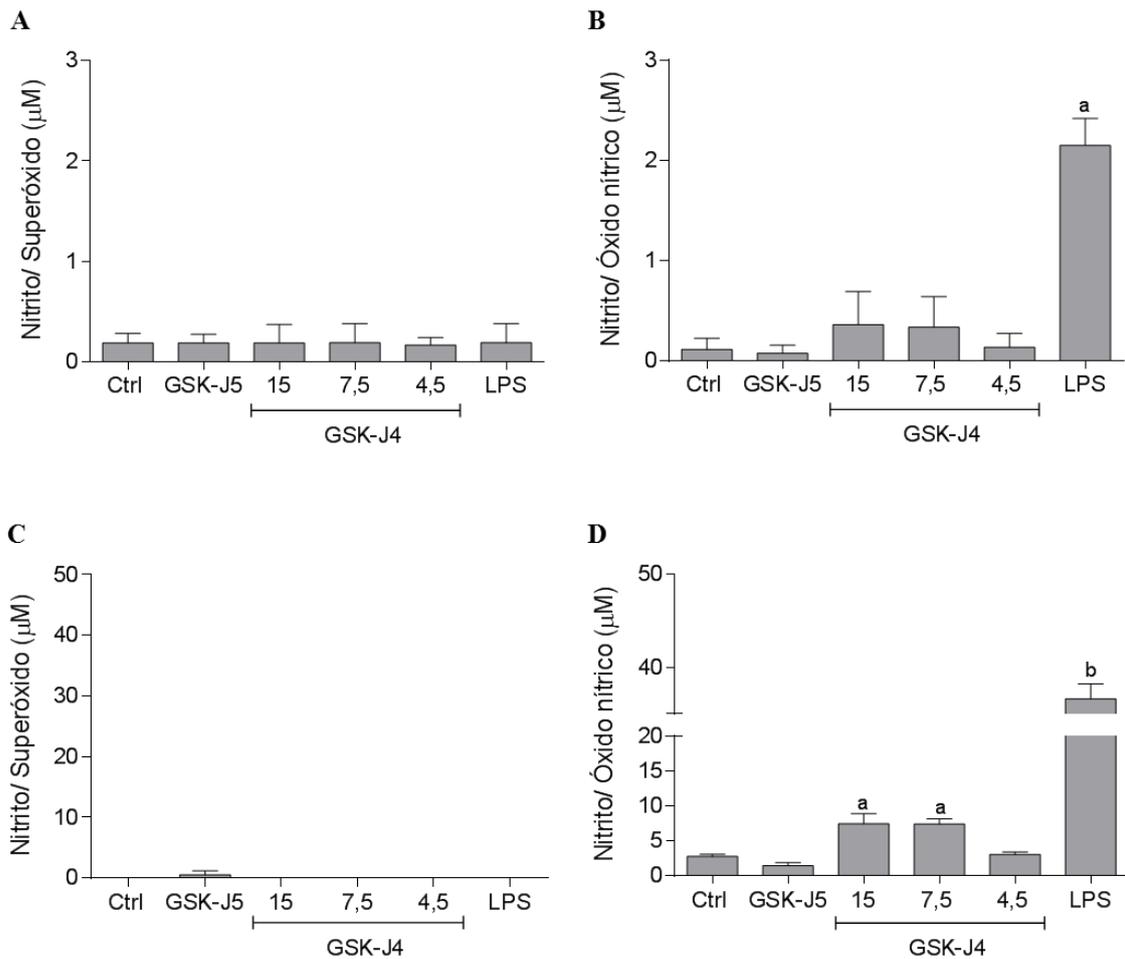


Figura 11. Dosagem indireta *in vitro* de EROs e NO em sobrenadante de macrófagos murinos infectados por *L. (V.) braziliensis* após exposição ao GSK-J4. Macrófagos murinos (3×10^5) infectados (10:1) foram expostos às concentrações de GSK-J4 (4,5 – 15 µM) e 15 µM de GSK-J5 por 24 horas. **(A e C)** Níveis de superóxido no sobrenadante de culturas expostas ao composto por 24 e 48 horas, respectivamente. **(B e D)** Níveis de óxido nítrico no sobrenadante de culturas expostas ao composto por 24 e 48 horas, respectivamente. Após período de exposição, os sobrenadantes das culturas foram utilizados para dosagem indireta de EROs e NO pelos níveis de nitrito utilizando reação de Griess. Níveis de EROs e NO expressos como as médias das triplicatas \pm SD, One-Way ANOVA. Gráfico representativo de dois experimentos independentes.

6.7. GSK-J4 É CAPAZ DE REDUZIR MCP-1 E AUMENTAR TNF- α EM MACRÓFAGOS MURINOS INFECTADOS

A dosagem dos níveis de citocinas inflamatórias é uma etapa importante na caracterização de um composto com perfil imunomodulador. Para tal, os níveis de citocinas foram dosadas por Citometria de Fluxo nos sobrenadantes de culturas de macrófagos murinos infectados ou não após 24 horas de exposição ao GSK-J4 (4,5 μ M; 7,5 μ M e 15 μ M). Os níveis das citocinas inflamatórias IL-6, IL-12 e IFN- γ (Figura 12A, C e D) e da citocina regulatória IL-10 (Figura 12B) não sofreram alteração após exposição ao GSK-J4 nos grupos não infectados e infectados com *L. (V.) braziliensis*. De modo surpreendente macrófagos não infectados expostos ao GSK-J4 revelaram um aumento nos níveis de TNF- α em relação ao grupo controle de maneira concentração-dependente. No caso dos macrófagos infectados e tratados, este aumento só é significativo com 20 μ M GSK-J4 (Figura 12E). Resultado semelhante pode ser observado em macrófagos não infectados que foram estimulados com 40 ng/mL de LPS na presença de 20 μ M de GSK-J4 (Figura 12G). Por outro lado, o composto reduziu os níveis da quimiocina MCP-1/CCL-2 na cultura de macrófagos infectados (Figura 12F). A redução observada nos níveis de MCP-1 ocorreu de forma concentração-dependente e é possível observar que a partir de 15 μ M os níveis são similares ao de macrófagos não infectados não tratados (35,5 pg/mL). Exceto pela redução nos níveis de MCP-1, GSK-J4 não demonstrou efeito anti-inflamatório nos níveis das citocinas dosadas.

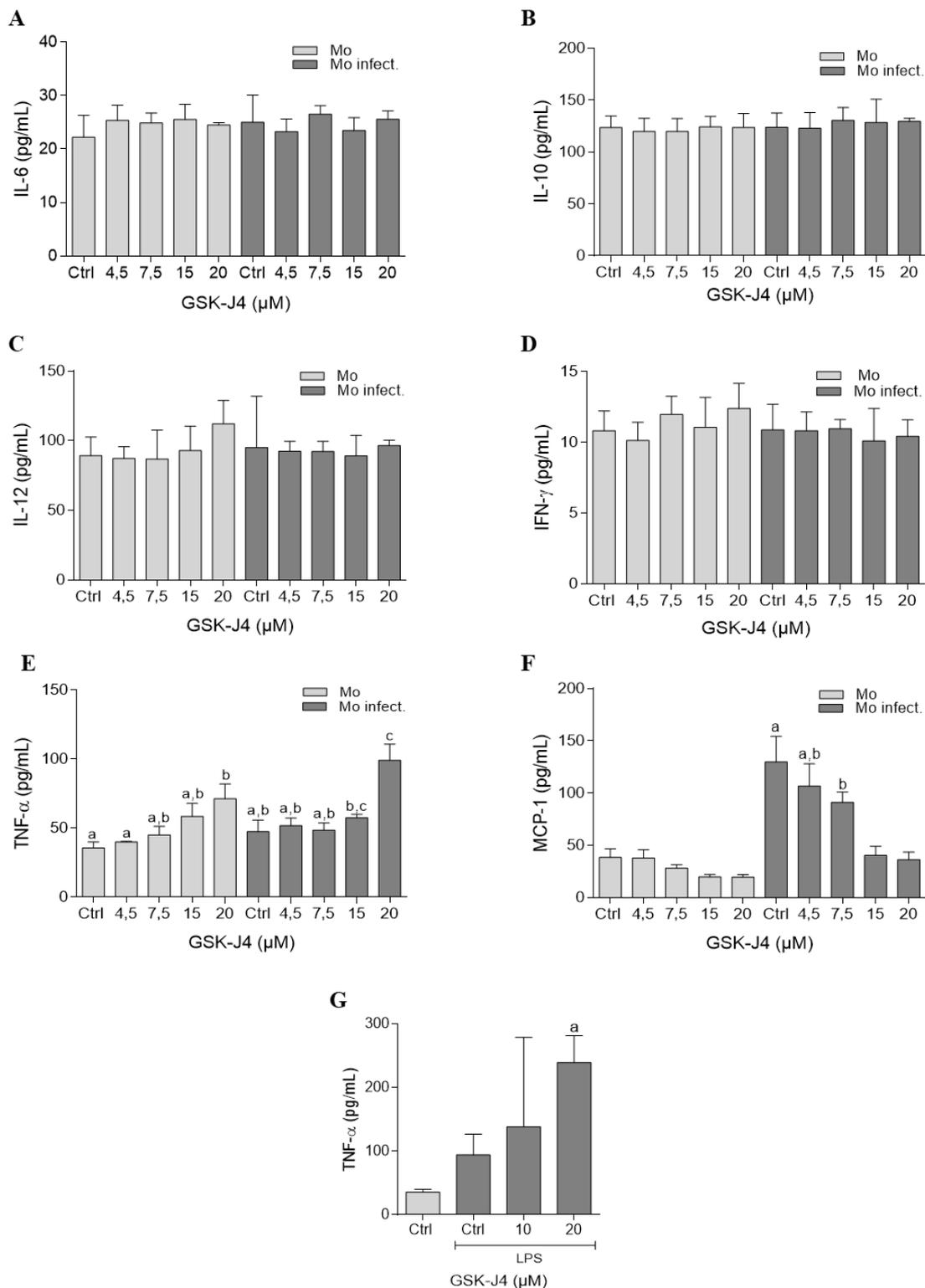


Figura 12. Dosagem *in vitro* de citocinas inflamatórias em sobrenadante de macrófagos murinos infectados por *L. (V.) braziliensis* após exposição ao GSK-J4. Macrófagos murinos (10^6) não infectados e infectados (10:1) foram expostos às concentrações de GSK-J4 (4,5 μM; 7,5 μM, 15 μM e 20 μM) por 24 horas. Após o período de exposição, os sobrenadantes das culturas foram utilizados para dosagem das citocinas inflamatórias por Citometria de Fluxo. **(A)** IFN- γ , **(B)** IL-6, **(C)** IL-12, **(D)** IL-10, **(E)** TNF- α e **(F)** MCP-1. **(G)** TNF- α no sobrenadante de macrófagos não infectados estimulados com 40 ng/mL de LPS e expostos a 10 μM e 20 μM de GSK-J4. Níveis de citocinas expressas como as médias das quadruplicatas \pm SD, One-Way ANOVA. Gráfico representativo de dois experimentos independentes.

6.8. TRATAMENTO INTRALESIONAL COM GSK-J4 REDUZ CARGA PARASITÁRIA E EVITA ULCERAÇÃO EM MODELO MURINO DE LC

Uma vez determinada atividade antiparasitária do GSK-J4 *in vitro* e sua capacidade de modular os níveis de MCP-1 e TNF- α nestas culturas, foram realizados estudos para avaliar a ação do composto *in vivo*. Foram realizados dois ensaios utilizando o modelo murino de LC de infecção na orelha. O bloco preliminar foi realizado com cinco doses de tratamento intralesional com intervalo de dois dias entre cada administração. Os animais foram separados em três grupos (n=6): controle (salina), DMSO (veículo do composto) e 4,5 μ M GSK-J4. Neste ensaio não houve diferença nas espessuras e nem na carga parasitária das lesões das orelhas ao final das dez semanas de acompanhamento (Figuras 13A e 13B). Contudo, 75% dos animais tratados com 4,5 μ M de GSK-J4 (CI₅₀) não desenvolveram úlceras (Figura 14). No segundo ensaio, os tratamentos intralesionais foram administrados em três doses durante uma semana. Os animais foram separados em três grupos (n=6): DMSO (0,44% (v/v) de DMSO em salina – veículo do composto) e dois grupos tratados com 50 μ M e 100 μ M de GSK-J4 em salina. A espessura das orelhas dos camundongos foi medida semanalmente e as curvas de progressão da lesão estão agrupadas na Figura 15A. Como é possível notar, não houve diferença nas espessuras das lesões e nem no tempo de cicatrização entre os grupos tratados com DMSO e os grupos que receberam GSK-J4. A carga parasitária nas lesões é um fator importante para avaliação do efeito do tratamento e foi determinada por diluição limitante ao fim da décima semana. As cargas parasitárias dos grupos estão plotadas no gráfico da Figura 15B. Como é possível observar, houve redução nas cargas parasitárias das lesões nos grupos tratados com 50 μ M (1×10^2) e 100 μ M ($1,6 \times 10^2$) de GSK-J4 em relação ao grupo tratado apenas com DMSO ($7,36 \times 10^3$). Esses valores de carga parasitária dos grupos tratados representam reduções de 98,64% e 97,82%, respectivamente. Não foi observada diferença estatística entre o efeito dos tratamentos com 50 e 100 μ M de GSK-J4.

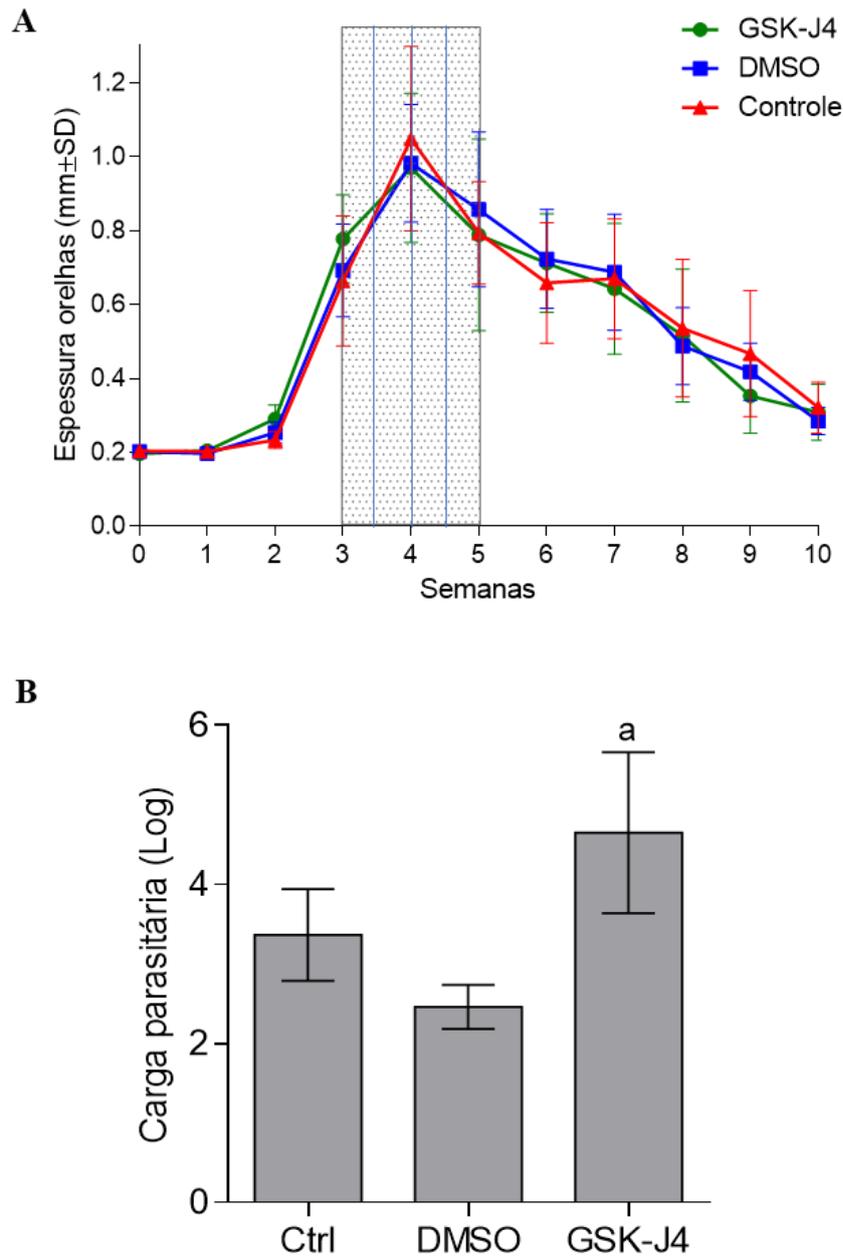


Figura 13. Tratamento intralesional preliminar com GSK-J4 em um modelo murino de LC causado por *L. (V.) braziliensis*. Camundongos foram infectados com promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (10^5) nas orelhas e, após três semanas de infec o, receberam cinco doses com intervalo de dois dias entre cada administra o. Os animais foram separados em três grupos (n=6): grupo controle (salina), grupo DMSO (veículo) e grupo tratado com 4,5 μ M de GSK-J4. **(A)** Progressão da doença foi monitorado por dez semanas pela medi o da espessura da orelha no local da lesão com auxílio de um paquímetro.  rea pontilhada no gráfico representa o período de tratamento e as linhas verticais as administra es. Espessura das lesões (em milímetros) expressa como as médias \pm SD. **(B)** Carga parasitária das orelhas dos grupos de tratamento representados em (A). A carga de parasitária foi determinada no local da infec o por análise de dilui o limitante. Número de parasitos (em logaritmo comum, decimal) expresso como as médias \pm SD, One-Way ANOVA.

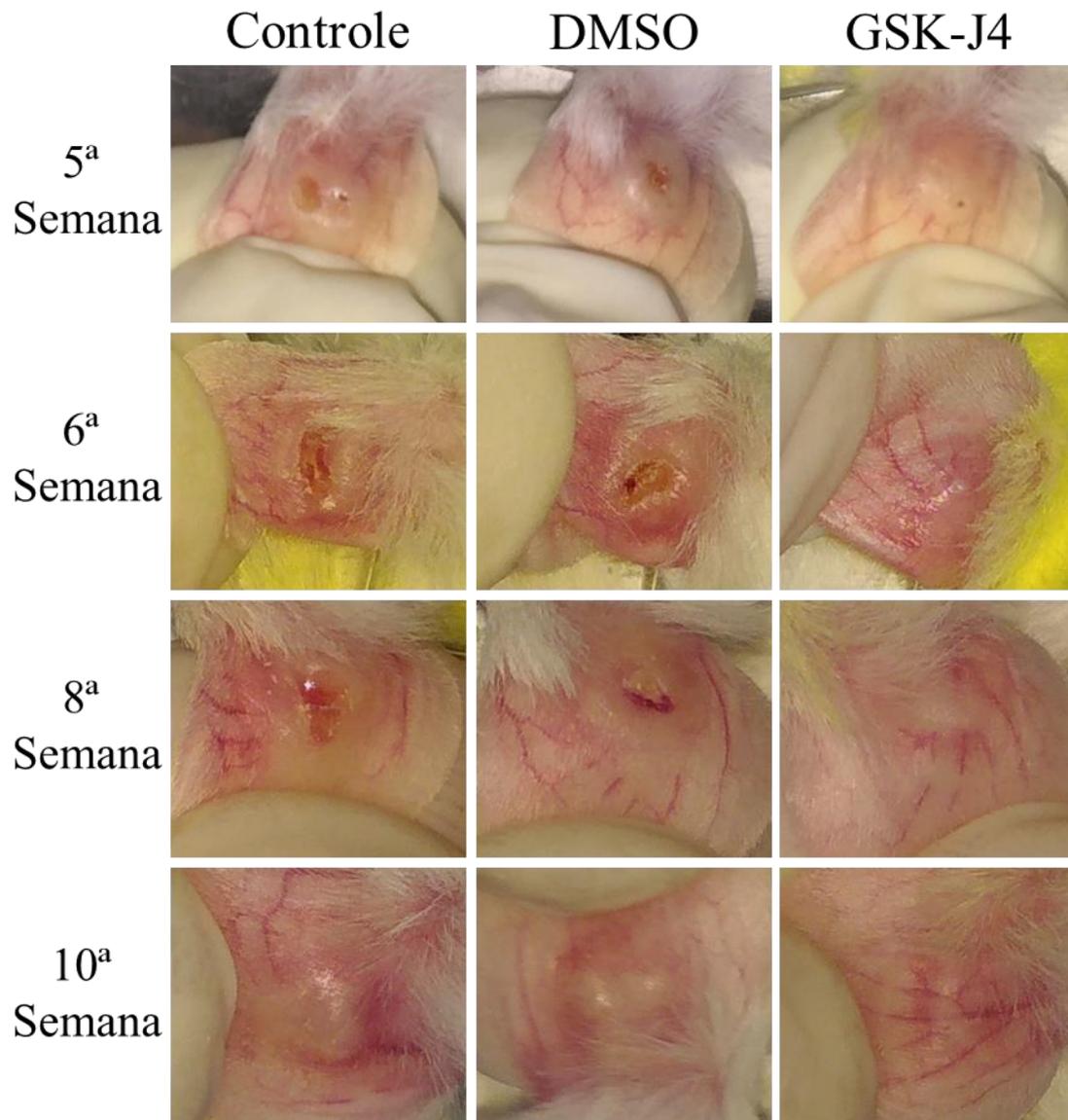


Figura 14. Desenvolvimento das lesões durante ensaio *in vivo* preliminar com tratamento intralesional de GSK-J4 em modelo murino de LC causado por *L. (V.) braziliensis*. Os camundongos BALB/C receberam 5 doses intralesionais de tratamento na orelha entre a 3^a e a 5^a semana após a infecção. Imagens dos grupos controle (salina), DMSO (veículo = 0,04% (v/v) DMSO e salina) e GSK-J4 (4,5 μ M) foram obtidas na 5^a, 6^a, 8^a e 10^a semana.

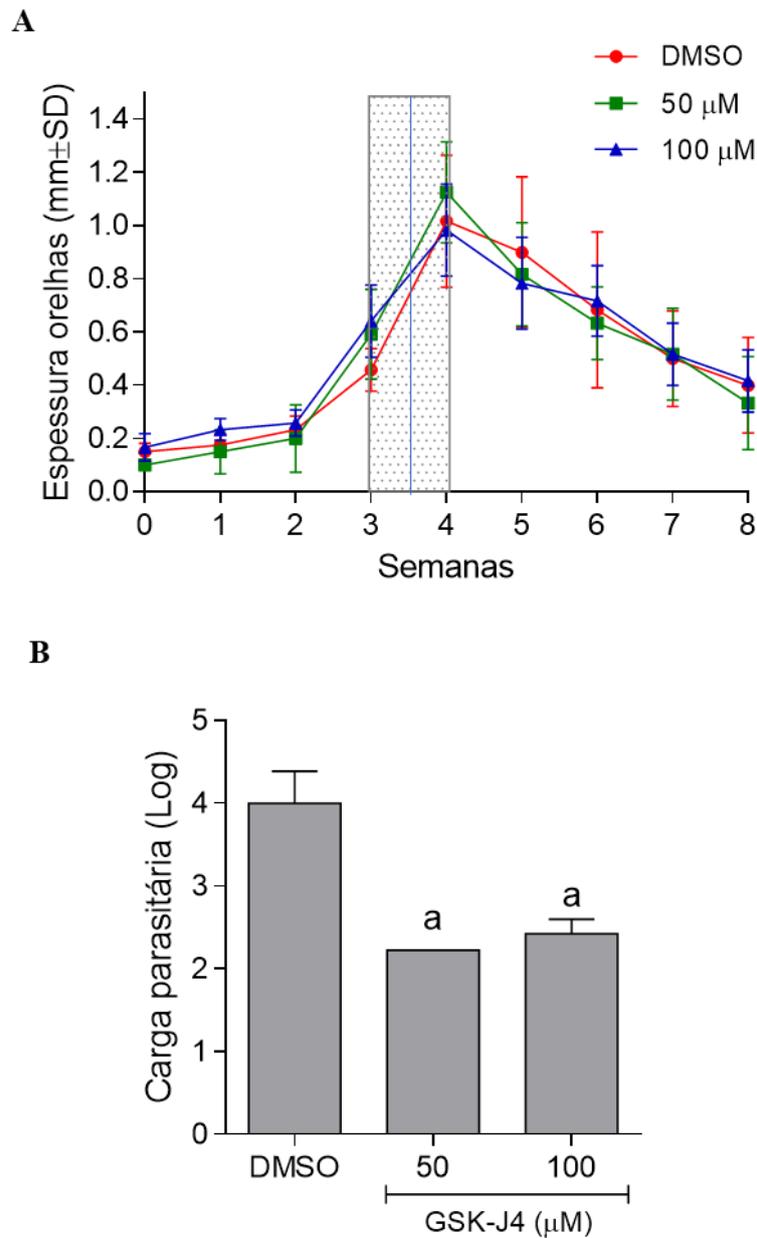


Figura 15. Tratamento intralesional com GSK-J4 em um modelo murino de LC causado por *L. (V.) braziliensis*. Camundongos foram infectados com promastigotas de *L. (V.) braziliensis* (10^5) nas orelhas e, após três semanas de infecção, receberam durante uma semana três doses dos tratamentos. Os animais foram separados em três grupos (n=6): grupo DMSO (veículo = DMSO), grupo tratado com 50 μ M de GSK-J4 e grupo tratado com 100 μ M de GSK-J4. **(A)** Progressão da doença foi monitorado por dez semanas pela medição da espessura da orelha no local da lesão com auxílio de um paquímetro. Área pontilhada no gráfico representa o período de tratamento e as linhas verticais as administrações. Espessura das lesões (em milímetros) expressa como as médias \pm SD. **(B)** Carga parasitárias das orelhas dos grupos de tratamento representados em (A). A carga de parasitária foi determinada no local da infecção por análise de diluição limitante. Número de parasitos (em logaritmo comum, decimal) expresso como as médias \pm SD, One-Way ANOVA.

7 DISCUSSÃO

O estigma social causado pela Leishmaniose Cutânea associado às deformidades e cicatrizes desfigurantes causadas pela doença são fatores de isolamento social e reduzem a produtividade econômica dos indivíduos acometidos (WHO, 2019). No que se refere ao tratamento da doença, a toxicidade das drogas disponíveis atualmente, associado ao uso parenteral, é um grande desafio a ser enfrentado na busca de um tratamento adequado e acessível. Nesse sentido, tratamentos mais seguros e acessíveis que facilitem o acesso dos pacientes com LC devem ser priorizados (BASANO; CAMARGO, 2004). As drogas atualmente preconizadas pelo Ministério da Saúde para o tratamento da LC são antimoniato de meglumina e anfotericina B (desoxicolato e lipossomal), ambas de uso sistêmico. Recentemente, a pentoxifilina via oral foi incorporada como opção terapêutica para os casos de LM, em associação ao antimoniato (Ministério da Saúde, 2017). A associação de drogas imunomoduladoras aos tratamentos com drogas com efeito leishmanicida tem se mostrado uma estratégia interessante no caso de falha terapêutica e na redução dos efeitos colaterais dos tratamentos atuais. Seguindo este racional e visando gerar novos conhecimentos sobre um inibidor que modula genes inflamatórios por mecanismos epigenéticos, avaliamos o efeito de GSK-J4 frente às formas evolutivas de *L. (V.) braziliensis in vitro* e em um modelo murino experimental de LC.

O GSK-J4 foi eficaz em inibir a proliferação de promastigotas e amastigotas em macrófagos murinos, com valores de CI_{50} de 888 nM e 4,5 μ M, respectivamente (Fig. 6 e 8). É importante frisar que além do GSK-J4 mostrar ação leishmanicida para ambas as formas evolutivas do parasito, o composto não comprometeu a viabilidade dos macrófagos murinos em concentrações de até 50 μ M (Fig. 9) apresentando $IS > 33,3$. O isômero inativo GSK-J5, com propriedades de permeabilidade celular análogas ao GSK-J4, não demonstrou atividade leishmanicida nas concentrações testadas (Fig. 6A).

Inibidores de histonas deacetilases (HDAC), outra classe de inibidores epigenéticos, foram testados *in vitro* em modelos de LC. Murrays e colaboradores (2011) demonstraram a baixa atividade de Apicidina ($CI_{50} > 30$ mg/mL) frente à promastigotas de *Leishmania donovani* e seu efeito tóxico para células de mamíferos nessa concentração (MURRAY et al., 2001). Outros quatro inibidores de HDACs foram testados contra promastigotas de *L. donovani*: Tricostatina A (CI_{50} 4,5 μ M), Vorinostat (CI_{50} 112,4 μ M) e dois cetólidos tricíclicos sintetizados (15b - CI_{50} 43 μ M e 15e - CI_{50} 4,9 μ M). Os índices de seletividade desses

compostos foram menores que 1 para células de mamíferos (ANDREWS; HAQUE; JONES, 2012; MAI et al., 2004; MWAKWARI et al., 2010; PATIL et al., 2010).

Posteriormente, Chua e colaboradores (2017) testaram Romidepsina, Belinostat, Vorinostat e Panobinostat frente à promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. donovani*. Nenhum dos compostos tiveram efeito leishmanicida para forma promastigota de *L. amazonensis* e quando avaliados nas concentrações de 1 μM ou 10 μM contra amastigotas de *L. amazonensis* apresentaram efeito tóxico para os macrófagos ou não apresentaram atividade leishmanicida. Os compostos apresentaram fraco efeito leishmanicida frente à promastigotas de *L. donovani* a 20 μM (20 - 35% de inibição), sem inibição de crescimento observado para Romidepsina. Da mesma forma, pouca atividade leishmanicida foi observada contra amastigotas axênicas de *L. donovani*. (CHUA et al., 2017). Os valores de CC_{50} destes compostos para células HEK293 variaram entre 0,005 – 1,4 μM (ENGEL et al., 2015). Dessa forma, o GSK-J4 possui valores CI_{50} e toxicidade mais baixos em relação aos reguladores epigenéticos testados em modelo de LC já descritos até o momento.

O teste de viabilidade intracelular revelou que o tratamento com 2,25 μM de GSK-J4 por 24 horas reduziu o número de parasitos intracelulares em 100% (Fig. 10). Esse resultado indica que uma fração dos parasitos detectados pelo método de contagem direta em lamínulas estejam inviáveis ou em processo de morte (e.g. culturas expostas a 3,75 μM de GSK-J4, Figura 8D). Levando em consideração a diferença nos efeitos observados entre os dois ensaios, também é plausível considerar que a CI_{50} estimada por contagem direta em lamínulas pode ser um valor superestimado, o que levanta discussões sobre o melhor método de avaliar o efeito de drogas no modelo em questão. Outro efeito curioso observado no ensaio de viabilidade intracelular foi o efeito leishmanicida que o isômero inativo (GSK-J5) exerceu sobre os parasitos (redução de 24,5% na concentração de 7,5 μM) (Fig. 10).

Kruidenier e colaboradores (2012) demonstraram que cerca de 39% do composto é detectado intracelularmente 1 hora após o tratamento de macrófagos humanos com 30 μM de GSK-J4 (KRUIDENIER et al., 2012). A partir destes dados podemos inferir que a concentração intracelular do composto no ensaio de CI_{50} seria de ~1,75 μM , e, CI_{90} seria de ~2,9 μM (Fig. 8A). Seguindo este mesmo racional, podemos inferir que a concentração de 877 nM seria capaz reduzir em 100% a carga de parasitos intracelulares no ensaio de viabilidade representado na Figura 10.

Enzimas envolvidas na modificação de histonas que podem influenciar processos como transcrição, replicação, reparo e recombinação do DNA foram identificadas no genoma dos

Tripanossomatídeos, incluindo duas famílias de acetiltransferases, pelo menos três famílias de metiltransferases e todas as três classes conhecidas de histona deacetilases (Ivens et al., 2006). Alguns destes alvos epigenéticos, são regulados diferencialmente em promastigotas e amastigotas em *Leishmania infatum*, *L. donovani* e *L. major* (revisado em (AFRIN; KHAN; HEMEG, 2019)). Em contrapartida, ainda não foram descritos genes de histonas demetilases em *Leishmania*. Em *Leishmania major* já foram identificadas seis enzimas capazes de metilar lisinas (e.g. DOT1) (Janzen, Hake, Lowell, & Cross, 2006). A DOT1 regulada a marca H3K79me3 em *Trypanosoma brucei*, a qual apresenta grande importância no ciclo celular do organismo (Janzen, Fernandez, et al., 2006). Partindo da informação que existem enzimas no genoma da *Leishmania* envolvidas na metilação de histonas como forma de regulação da expressão gênica, é razoável imaginar que também devam existir enzimas capazes de remover essas marcas. Com esse racional, buscas *in silico* realizadas no genoma de *L. (V.) braziliensis* por nosso grupo identificaram 5 sequências contendo domínios JmjC no genoma de *L. (V.) braziliensis* que são enzimas candidatas a participarem da regulação da cromatina (Clissold & Ponting, 2001). Entretanto, nenhuma delas apresentou domínios extensos e conservados similares a demetilases já caracterizadas (Fig. 7), indicando que os alvos moleculares (KDM6A/UTX e KDM6B/JMJD3) do GSK-J4 não estão presentes em *Leishmania*. A partir destas análises podemos concluir que a atividade antiparasitária do GSK-J4 em promastigotas certamente se deve a mecanismos distintos daqueles envolvendo a enzima JMJD3 de mamíferos.

Em macrófagos ativados, a principal forma de eliminação da *Leishmania* ocorre pela produção de óxido nítrico e espécies reativas de oxigênio (revisado em (SCOTT; NOVAIS, 2016)). No modelo murino, a produção de IFN- γ e a síntese de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio por macrófagos também são necessários para o controle da infecção por *Leishmania*. No presente trabalho, as culturas de macrófagos murinos infectados com *L. (V.) braziliensis* expostas a 7,5 μ M e 15 μ M de GSK-J4 só produziram níveis significativos de NO após 48 horas de tratamento (Fig. 11D). Estes dados sugerem que a redução da carga parasitária observada nas primeiras 24 horas esteja ocorrendo por um efeito direto do composto sobre o parasito, enquanto os mecanismos de resposta inata do macrófago aparecem em um momento mais tardio. Não foi possível dosar os níveis de superóxido nos sobrenadantes das culturas de macrófagos murinos infectados expostos ao GSK-J4. Isso pode ter ocorrido devido a oxidação do nitrito em nitrato durante o período de incubação (GIUSTARINI et al., 2008). Outra possibilidade é que os níveis de superóxido sejam efetivamente baixo, como já observado na

resposta imune de camundongos durante a infecção por *Leishmania* (ROCHA et al., 2007). Dessa forma, outros ensaios para dosagem de espécies reativas de oxigênio, como ELISA, são necessários para esclarecer o efeito de GSK-J4 sobre a produção de ROS.

Apesar de existir um paradigma da resposta imune do tipo Th1 ser associada ao controle e cura da infecção por *Leishmania* em humanos, as formas clínicas cutâneas e mucosas são consideradas reações inflamatórias mediadas pela resposta imune (revisado em (RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998a)). IFN- γ e TNF- α são duas citocinas pró-inflamatórias importantes envolvidas na proteção e patologia da LC. Contudo, a produção excessiva dessas citocinas pró-inflamatórias estão associados ao aumento do dano tecidual. Uma correlação positiva entre o tamanho da lesão e os níveis de IFN- γ e TNF- α foi observado em pacientes com LC causada por *L. (V.) braziliensis* (ANTONELLI et al., 2004, 2005; BACELLAR et al., 2002). GSK-J4 já foi descrito por reduzir a produção de IFN- γ e TNF- α em modelos de doenças inflamatórias como Artrite Reumatoide, Encefalomielite e Sepse (DOÑAS et al., 2016; KRUIDENIER et al., 2012; PAN et al., 2018). No estudo de sepsis, Pan e colaboradores (2018) descreveram atividade regulatória de GSK-J4 (4 μ M) nos transcritos de IFN- γ em macrófagos RAW264.7 estimulados com 100 ng/mL de LPS em 6 h e 12 h. Em 24 h não houve diferença entre o grupo apenas estimulado com LPS e o grupo estimulado e tratado com GSK-J4 (PAN et al., 2018). No estudo de EAE, Doñas e colaboradores (2016) demonstraram por citometria de fluxo que houve regulação de IFN- γ em células dendríticas estimuladas com 100 ng/mL de LPS na presença de 25 nM GSK-J4 por 16h (DOÑAS et al., 2016). Em nosso estudo, macrófagos murinos infectados com *L. (V.) braziliensis* foram expostos por 24 horas ao GSK-J4. Entretanto, o processo de infecção não alterou os níveis de IFN- γ em relação ao controle não infectado, de forma que não conseguimos avaliar a capacidade regulatória do composto sobre esta citocina (Fig. 12D).

Kruidenier e colaboradores (2012) reportaram pela primeira vez a capacidade de GSK-J4 em reduzir os níveis de TNF- α via inibição de JMJD3 em um modelo de doença inflamatória (KRUIDENIER et al., 2012). O grupo estabeleceu a CI_{50} em 9 μ M para TNF- α em macrófagos humanos estimulados com 10 ng/mL de LPS ou derivados de pacientes com Artrite Reumatoide (KRUIDENIER et al., 2012). A cinética da modulação foi avaliada em até 6 horas. Doñas e colaboradores (2016) também descreveram a função regulatória de GSK-J4 nos níveis desta citocina em células dendríticas estimuladas com LPS em 16 horas de exposição (DOÑAS et al., 2016). Pan e colaboradores (2018) descreveram a diminuição dos níveis dos transcritos de TNF- α após 24 horas de exposição de macrófagos RAW264.7 estimulados com LPS na presença de

GSK-J4 (PAN et al., 2018). Curiosamente, em nossos ensaios o GSK-J4 não reduziu os níveis desta citocina em nenhum dos cenários analisados (macrófagos não infectados; macrófagos infectados e tratados; e macrófagos estimulados com LPS na presença do composto) (Fig. 12D e E). Embora este efeito observado em nossos ensaios seja contrário aos descritos na literatura, este resultado foi observado em todas as repetições independentes dos ensaios. A expressão de JMJD3 e a regulação das marcas presentes nos genes a serem transcritos variam de acordo com o estímulo e tipo celular, influenciando vários processos celulares, como expressão de citocinas, diferenciação celular, proliferação, senescência e apoptose (BURCHFIELD et al., 2015). O padrão observado em nossos ensaios pode estar relacionado com a forma de obtenção e cultura dos macrófagos, com o estímulo proveniente da infecção, ou ainda, com o aumento dos níveis de óxido nítrico observados anteriormente (Fig. 11B e D), uma vez que esta citocina é importante para ativação de macrófagos e da resposta imune inata da célula contra patógenos. Também não foram observados os efeitos regulatórios do composto nos níveis de IL-6 e IL-12, como descrito nos trabalhos realizados em modelo murino de Diabetes Tipo 2, EAE e Sepse (DOÑAS et al., 2016; GALLAGHER et al., 2015; PAN et al., 2018), bem como nos níveis de IL-10. Novamente, o processo de infecção não alterou os níveis de IL-6, IL-12 e IL-10 em relação ao controle não infectado (Fig. 12A, B e C), de forma que não conseguimos avaliar a capacidade regulatória do composto sobre estas citocinas.

A quimiocina MCP-1 é essencial no recrutamento de monócitos da medula óssea para o local da inflamação, inclusive em lesões cutâneas causadas por *L. major* e *L. mexicana* (QUINONES et al., 2007; RITTER; KÖRNER, 2002). Em biópsias de lesões de pacientes infectados por *L. (V.) braziliensis* a expressão do gene MCP-1 foi significativamente maior em comparação as amostras de pele de indivíduos saudáveis (CAMPANELLI et al., 2010; PASSOS et al., 2015). MCP-1 é expressa preferencialmente em macrófagos clássicos (perfil inflamatório) e intermediários, ao passo que os macrófagos não clássicos falham em expressar MCP-1 (BJÖRKANDER et al., 2013). De forma complementar, a frequência de macrófagos ativados no local da lesão se correlaciona com a área da necrose e o tamanho da úlcera (SALDANHA et al., 2017). GSK-J4 reduziu os níveis de MCP-1 em macrófagos infectados por *L. (V.) braziliensis* de uma forma concentração-dependente. As concentrações de 15 μ M e 20 μ M de GSK-J4 reduziram a produção desta quimiocina para níveis similares ao de macrófagos não infectados (Fig. 12F). A redução dos níveis de MCP-1 após exposição ao GSK-J4 já havia sido descrita em modelo *in vivo* de sepse e em macrófagos RAW264.7 estimulados com LPS (PAN et al., 2018).

Após avaliar a atividade de GSK-J4 frente as formas evolutivas do parasito e células do hospedeiro *in vitro*, decidimos avaliar seu efeito *in vivo*. Realizamos, previamente, um tratamento *in vivo* com administrações intralesionais de GSK-J4 em modelo murino de LC causado por *L. (V.) braziliensis*. Neste primeiro ensaio utilizamos 4,5 μM do composto, concentração referente à CI_{50} encontrada *in vitro* para a forma amastigota. Embora o GSK-J4 já tenha sido utilizado *in vivo* em alguns modelos murinos de forma sistêmica, optamos por administrações intralesionais pelo fato do composto inibir uma enzima de ação pleiotrópica (envolvida na regulação da expressão de uma série de genes). Como não havia informações sobre a utilização tópica do composto, dessa forma decidimos inicialmente utilizar uma concentração considerada “baixa”. Neste ensaio preliminar, não houve redução da espessura das lesões e nem da carga parasitária (Fig. 13). Contudo, o tratamento reduziu em 75% o desenvolvimento de úlceras nas orelhas dos camundongos (Fig. 14).

Em um segundo ensaio, avaliamos doses mais altas de tratamento (50 μM e 100 μM), porém com menos administrações. Embora tenhamos administrado menos doses, o aumento da concentração resultou na redução de aproximadamente 98% da carga parasitária na orelha dos camundongos (Fig. 15). Efeito similar na ulceração e no aspecto inflamatório das orelhas também foi observado no segundo ensaio. A resposta imune do tipo Th1 com produção de $\text{IFN-}\gamma$ e síntese de óxido nítrico por macrófagos é necessária para resolver infecções por espécies de *Leishmania* (revisado em (RIBEIRO-DE-JESUS et al., 1998)). As evidências de que a infecção por *L. (V.) braziliensis* pode desencadear uma resposta imune intensa e persistente com um nível não modulado e elevado de componentes pró-inflamatórios reforçam a importância do uso de imunomoduladores na terapia da leishmaniose. Além disso, foi relatado que imunomoduladores, como o fator estimulador de colônias de macrófagos de granulócitos (GM-CSF) e a pentoxifilina, aceleram o tempo de cicatrização da LC (ALMEIDA et al., 1999; SANTOS et al., 2004), curam a Leishmaniose Mucosa Refratária à terapia com Sb^{v} sozinho (LESSA et al., 2001) e casos mais graves da forma mucosa (MACHADO et al., 2007). Portanto, a associação entre drogas que desempenham funções moduladoras da resposta inflamatória e os tratamentos com drogas leishmanicida pode contribuir para controlar a resposta inflamatória e o dano tecidual, facilitando, assim, a destruição do agente parasitário pelo hospedeiro. Apesar de não termos analisado o perfil de citocinas nas lesões das orelhas, algumas inferências podem ser feitas tentando associar os achados *in vitro* (cultura de macrófagos) e os achados *in vivo* após exposição ao GSK-J4. A redução na abertura de úlceras pode estar relacionada com a redução dos níveis de MCP-1 observada anteriormente nos ensaios *in vitro*. Achados similares

já foram observados *in vitro* e *in vivo* para o modelo de sepse em murinos tratados com GSK-J4 (PAN et al., 2018). O aumento dos níveis de TNF- α *in vitro*, caso seja observado *in vivo*, pode ser um fator importante que contribuiu para redução das úlceras. Essa citocina está envolvida com os processos de ativação de macrófagos e redução da carga parasitária via EROs e NO (NOVAIS et al., 2014). Dessa forma, o GSK-J4 pode ter ativado os macrófagos pela indução de TNF- α e reduzido a migração de células inflamatórias ativadas para o local da infecção via MCP-1, diminuindo a carga parasitária e reduzindo a formação das úlceras. Porém, ensaios adicionais de dosagem de citocinas e imuno-histoquímica no tecido são necessários para confirmar essas hipóteses.

Um futuro desdobramento seria investigar detalhadamente a resposta leishmanicida dos macrófagos por espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, bem como avaliar as citocinas por outro método de detecção. Outro desdobramento do trabalho seria explorar a coadministração do composto com drogas leishmanicidas já utilizadas em doses menores como estratégia terapêutica para redução de toxicidade e avaliar o efeito do composto no tecido por análise de cortes histológicos, imuno-histoquímica e dosagem das citocinas. Portanto, estudos mais aprofundados precisam ser realizados *in vitro* para compreensão do mecanismo de ação de GSK-J4 sob o parasito e sob a célula infectada, e *in vivo* para padronização e determinação da eficácia do tratamento combinado.

8 CONCLUSÃO

No presente trabalho observamos que GSK-J4 possui efeito antiparasitário sob ambas as formas de *L. (V.) braziliensis* sem afetar a viabilidade da célula hospedeira. Dados de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio sugerem que a redução inicial (24 h) da carga parasitária ocorre principalmente por um efeito direto do composto sobre o parasito. Em um segundo momento (48 h) o NO deve auxiliar na eliminação do parasito. De maneira inesperada, o GSK-J4 promoveu o aumento dos níveis de TNF- α e reduziu os níveis de MCP-1 *in vitro*. *In vivo*, observamos que o tratamento com GSK-J4 reduziu a carga parasitária no local da infecção e interferiu no processo inflamatório de ulceração nas orelhas dos camundongos.

REFERÊNCIAS

- ABDOLI, A.; MASPI, N.; GHAFFARIFAR, F. Wound healing in cutaneous leishmaniasis: A double edged sword of IL-10 and TGF- β . **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 51, p. 15–26, 2017.
- AFRIN, F.; KHAN, I.; HEMEG, H. A. **Leishmania-host interactions-an epigenetic paradigm** *Frontiers in Immunology*, 2019.
- AGGER, K. *et al.* UTX and JMJD3 are histone H3K27 demethylases involved in HOX gene regulation and development. **Nature**, v. 449, n. 7163, p. 731–734, 2007.
- ALEXANDER, J. *et al.* Endogenous IL-4 is necessary for effective drug therapy against visceral leishmaniasis. **European Journal of Immunology**, 2000.
- ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. Leishmania species: models of intracellular parasitism. **Journal of cell science**, 1999.
- ALMEIDA, L. *et al.* Analysis of expression of FLI1 and MMP1 in American cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania braziliensis infection. **Infection, Genetics and Evolution**, 2017.
- ALMEIDA, R. *et al.* Randomized, double-blind study of stibogluconate plus human granulocyte macrophage colony-stimulating factor versus stibogluconate alone in the treatment of cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 180, n. 5, p. 1735–7, 1999.
- ALMEIDA, R. P. *et al.* Successful treatment of refractory cutaneous leishmaniasis with GM-CSF and antimonials. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 2005.
- ANDREWS, K. T.; HAQUE, A.; JONES, M. K. HDAC inhibitors in parasitic diseases. **Immunology and cell biology**, v. 90, n. 1, p. 66–77, 2012.
- ANTONELLI, L. R. V. *et al.* Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. **Clinical and Experimental Immunology**, 2004.
- 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, 2005.
- ARROWSMITH, C. H. *et al.* Epigenetic protein families: a new frontier for drug discovery. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 11, n. 5, p. 384–400, 2012.
- BACELLAR, O. *et al.* Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and Immunity**, 2002.
- BASANO, S. DE A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, 2004.

- BAYARSAIHAN, D. Epigenetic mechanisms in inflammation. **Journal of dental research**, v. 90, n. 1, p. 9–17, 2011.
- BITTENCOURT, A. L.; BARRAL, A. Evaluation of the histopathological classifications of American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1991.
- BJÖRKANDER, S. *et al.* Peripheral monocyte expression of the chemokine receptors CCR2, CCR5 and CXCR3 is altered at parturition in healthy Women and in women with systemic lupus erythematosus. **Scandinavian Journal of Immunology**, 2013.
- BURCHFIELD, J. S. *et al.* **JMJD3 as an epigenetic regulator in development and disease** **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, 2015.
- CALEGARI-SILVA, T. C. *et al.* Leishmania amazonensis downregulates macrophage iNOS expression via Histone Deacetylase 1 (HDAC1): a novel parasite evasion mechanism. **European Journal of Immunology**, 2018.
- CAMPANELLI, A. P. *et al.* Chemokines and chemokine receptors coordinate the inflammatory immune response in human cutaneous leishmaniasis. **Human Immunology**, v. 71, n. 12, p. 1220–1227, 2010.
- CASTELLANO, L. R. *et al.* Th1/Th2 immune responses are associated with active cutaneous leishmaniasis and clinical cure is associated with strong interferon- γ production. **Human Immunology**, v. 70, n. 6, p. 383–390, 2009.
- CHUA, M. J. *et al.* Effect of clinically approved HDAC inhibitors on Plasmodium, Leishmania and Schistosoma parasite growth. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, 2017.
- COCK-RADA, A. M. *et al.* SMYD3 promotes cancer invasion by epigenetic upregulation of the metalloproteinase MMP-9. **Cancer Research**, v. 72, p. 810–820, 2012.
- CROFT, S. L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy-challenges and opportunities. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 10, p. 1478–1483, 2011.
- CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis Drug Resistance in Leishmaniasis. **Society**, v. 19, n. 1, p. 111–126, 2006.
- CRONEMBERGER-ANDRADE, A. *et al.* Extracellular Vesicles from Leishmania-Infected Macrophages Confer an Anti-infection Cytokine-Production Profile to Naïve Macrophages. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 2014.
- DAS, N. D. *et al.* Gene networking and inflammatory pathway analysis in a JMJD3 knockdown human monocytic cell line. **Cell Biochemistry and Function**, 2012.
- DE SANTA, F. *et al.* The Histone H3 Lysine-27 Demethylase Jmjd3 Links Inflammation to Inhibition of Polycomb-Mediated Gene Silencing. **Cell**, v. 130, n. 6, p. 1083–1094, 2007.
- DE SANTA, F. *et al.* Jmjd3 contributes to the control of gene expression in LPS-activated

macrophages. **EMBO Journal**, 2009.

DOÑAS, C. *et al.* The histone demethylase inhibitor GSK-J4 limits inflammation through the induction of a tolerogenic phenotype on DCs. **Journal of Autoimmunity**, 2016.

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

FERNANDES, A. C. B. S. *et al.* In vitro characterization of Leishmania (Viannia) braziliensis isolates from patients with different responses to Glucantime® treatment from Northwest Paraná, Brazil. **Experimental Parasitology**, 2016.

FOCUS, E. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. n. 22, p. 285–296, 2016.

FRANCIS, N. J.; KINGSTON, R. E.; WOODCOCK, C. L. Chromatin compaction by a polycomb group protein complex. **Science**, v. 306, n. 5701, p. 1574–1577, 2004.

FÜLLGRABE, J.; KAVANAGH, E.; JOSEPH, B. **Histone onco-modificationsOncogene**, 2011.

GALLAGHER, K. A. *et al.* Epigenetic changes in bone marrow progenitor cells influence the inflammatory phenotype and alter wound healing in type 2 diabetes. **Diabetes**, v. 64, n. 4, p. 1420–1430, 2015.

GARNIER, T.; CROFT, S. L. Topical treatment for cutaneous leishmaniasis. **Current opinion in investigational drugs (London, England : 2000)**, v. 3, n. 4, p. 538–44, 2002.

GIUDICE, A. *et al.* Macrophages participate in host protection and the disease pathology associated with Leishmania braziliensis infection. **BMC Infectious Diseases**, v. 12, n. 1, p. 75, 2012.

GIUSTARINI, D. *et al.* **Nitrite and Nitrate Measurement by Griess Reagent in Human Plasma: Evaluation of Interferences and StandardizationMethods in Enzymology**, 2008.

GRASSO, C. S. *et al.* Functionally defined therapeutic targets in diffuse intrinsic pontine glioma. **Nature Medicine**, v. 21, n. 6, p. 555–559, 2015.

HASHIZUME, R. *et al.* Pharmacologic inhibition of histone demethylation as a therapy for pediatric brainstem glioma. **Nature medicine**, v. 20, n. 12, p. 1394–6, 2014.

ISHII, M. *et al.* CC chemokine receptor 4 modulates Toll-like receptor 9-mediated innate immunity and signaling. **European Journal of Immunology**, 2008.

IVENS, A. C. *et al.* The genome of the kinetoplastid parasite, Leishmania major. **Science**, 2005.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.

KHOURI, R. *et al.* IFN- β Impairs Superoxide-Dependent Parasite Killing in Human Macrophages: Evidence for a Deleterious Role of SOD1 in Cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, 2009.

KHOURI, R. *et al.* DETC induces Leishmania parasite killing in human invitro and murine in vivo models: A promising therapeutic alternative in leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 5, n. 12, p. 8–9, 2010.

KLOSE, R. J.; KALLIN, E. M.; ZHANG, Y. JmjC-domain-containing proteins and histone demethylation. **Nature reviews. Genetics**, v. 7, p. 715–27, 2006.

KRUIDENIER, L. *et al.* A selective jumonji H3K27 demethylase inhibitor modulates the proinflammatory macrophage response. **Nature**, v. 488, n. 7411, p. 404–8, 2012.

KUZMICHEV, A. *et al.* Histone methyltransferase activity associated with a human multiprotein complex containing the enhancer of zeste protein. **Genes and Development**, v. 16, n. 22, p. 2893–2905, 2002.

LAFFITTE, M.-C. N. *et al.* Plasticity of the Leishmania genome leading to gene copy number variations and drug resistance. **F1000Research**, 2016.

LAMOTTE, S. *et al.* **The enemy within: Targeting host–parasite interaction for antileishmanial drug discovery** PLoS Neglected Tropical Diseases, 2017.

LAN, F. *et al.* A histone H3 lysine 27 demethylase regulates animal posterior development. **Nature**, v. 449, n. 7163, p. 689–694, 2007.

LANDÉN, N. X.; LI, D.; STÅHLE, M. Transition from inflammation to proliferation: a critical step during wound healing. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 73, n. 20, p. 3861–3885, 2016.

LEE, K. *et al.* Molecular mechanism of Jmjd3-mediated interleukin-6 gene regulation in endothelial cells underlying spinal cord injury. **Journal of Neurochemistry**, 2012.

LENG, J. *et al.* Toxoplasma gondii prevents chromatin remodeling initiated by TLR-triggered macrophage activation. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 182, p. 489–97, 2009.

LESSA, H. A. *et al.* Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 2, p. 87–89, 2001.

LEWIS, C. J. *et al.* The Epigenetic Regulation of Wound Healing. **Advances in wound care**, v. 3, n. 7, p. 468–475, 2014.

LIMA, G. M. C. A. *et al.* Susceptibility and resistance to Leishmania amazonensis in H-2(q) syngeneic high and low antibody responder mice (Biozzi mice). **Scandinavian Journal of Immunology**, 1998.

LUND, A. H.; VAN LOHUIZEN, M. **Polycomb complexes and silencing**

mechanisms *Current Opinion in Cell Biology*, 2004.

MACHADO, P. R. L. *et al.* Oral Pentoxifylline Combined with Pentavalent Antimony: A Randomized Trial for Mucosal Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, 2007.

MAI, A. *et al.* **Antimalarial and Antileishmanial Activities of Aroyl-Pyrrolyl-Hydroxyamides, a New Class of Histone Deacetylase Inhibitors [2]** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 2004.

MARR, A. K. *et al.* Leishmania donovani Infection Causes Distinct Epigenetic DNA Methylation Changes in Host Macrophages. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 10, 2014.

MEHTA, S.; JEFFREY, K. L. Beyond receptors and signaling: epigenetic factors in the regulation of innate immunity. **Immunology and Cell Biology**, v. 93, n. 10, p. 233–244, 2015.

MELBY, P. C. *et al.* Increased expression of proinflammatory cytokines in chronic lesions of human cutaneous leishmaniasis. **Infection and Immunity**, v. 62, n. 3, p. 837–842, 1994.

MIN, J.; ZHANG, Y.; XU, R. M. Structural basis for specific binding of polycomb chromodomain to histone H3 methylated at Lys 27. **Genes and Development**, v. 17, n. 15, p. 1823–1828, 2003.

MÜLLER, J. *et al.* Histone methyltransferase activity of a Drosophila Polycomb group repressor complex. **Cell**, v. 111, n. 2, p. 197–208, 2002.

MÜLLER, K. *et al.* Chemokines, natural killer cells and granulocytes in the early course of Leishmania major infection in mice. **Medical Microbiology and Immunology**, 2001.

MURRAY, P. J. *et al.* The synthesis of cyclic tetrapeptoid analogues of the antiprotozoal natural product apicidin. **Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters**, 2001.

MWAKWARI, S. C. *et al.* Non-peptide macrocyclic histone deacetylase inhibitors derived from tricyclic ketolide skeleton. **Journal of Medicinal Chemistry**, 2010.

NAGLE, A. S. *et al.* Recent developments in drug discovery for leishmaniasis and human african trypanosomiasis. **Chemical Reviews**, v. 114, n. 22, p. 11305–11347, 2014.

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.

NTZIACHRISTOS, P. *et al.* Contrasting roles of histone 3 lysine 27 demethylases in acute lymphoblastic leukaemia. **Nature**, v. 514, n. 7523, p. 513–7, 2014.

OLIVEIRA, F. *et al.* Lesion size correlates with Leishmania antigen-stimulated TNF-levels in human cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, 2011.

PAN, Y. *et al.* GSKJ4 protects mice against early sepsis via reducing proinflammatory factors

and up-regulating MiR-146a. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. OCT, 2018.

PASSOS, S. *et al.* Intermediate monocytes contribute to pathologic immune response in leishmania braziliensis infections. **Journal of Infectious Diseases**, 2015.

PATIL, V. *et al.* Antimalarial and antileishmanial activities of histone deacetylase inhibitors with triazole-linked cap group. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, 2010.

PEARSON, R. D.; DE QUEIROZ SOUSA, A. **Clinical spectrum of leishmaniasis** **Clinical Infectious Diseases**, 1996.

PHAM, D. *et al.* Opposing Roles of STAT4 and Dnmt3a in Th1 Gene Regulation. **The Journal of Immunology**, v. 191, n. 2, p. 902–911, 2013.

PLATH, K. *et al.* Role of histone H3 lysine 27 methylation in X inactivation. **Science**, v. 300, n. 5616, p. 131–135, 2003.

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. e0006052, 2017.

PRZANOWSKI, P. *et al.* The signal transducers Stat1 and Stat3 and their novel target Jmjd3 drive the expression of inflammatory genes in microglia. **Journal of Molecular Medicine**, v. 92, n. 3, p. 239–254, 2014.

QUINONES, M. P. *et al.* CCL2-independent role of CCR2 in immune responses against *Leishmania major*. **Parasite Immunology**, 2007.

RAHMAN, R. *et al.* Safety and efficacy of short course combination regimens with AmBisome, miltefosine and paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis (VL) in Bangladesh. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 5, p. 1–15, 2017.

RETHI, B.; EIDSMO, L. FasL and TRAIL signaling in the skin during cutaneous leishmaniasis - implications for tissue immunopathology and infectious control. **Frontiers in Immunology**, v. 3, n. JUN, p. 1–8, 2012.

RIBEIRO-DE-JESUS, A. *et al.* Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 31, n. 1, p. 143–148, 1998a.

RIBEIRO-DE-JESUS, A. *et al.* Cytokine profile and pathology in human leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, 1998b.

RIBEIRO-GOMES, F. L. *et al.* Macrophage Interactions with Neutrophils Regulate *Leishmania major* Infection. **The Journal of Immunology**, v. 172, n. 7, p. 4454–4462, 2014.

RITTER, U.; KÖRNER, H. **Divergent expression of inflammatory dermal chemokines in cutaneous leishmaniasis**. *Parasite Immunology*. **Anais...2002**

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**, 2007.

ROSAS, L. E. *et al.* Genetic background influences immune responses and disease outcome of cutaneous *L. mexicana* infection in mice. **International Immunology**, 2005.

RUTHENBURG, A. J. *et al.* **Multivalent engagement of chromatin modifications by linked binding modules** *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2007.

SALDANHA, M. G. *et al.* Characterization of the Histopathologic Features in Patients in the Early and Late Phases of Cutaneous Leishmaniasis. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 96, n. 3, p. 16–0539, 2017.

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, 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**, 2004.

SCORZA, B. M.; CARVALHO, E. M.; WILSON, M. E. Cutaneous manifestations of human and murine leishmaniasis. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 6, 2017.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. **Cutaneous leishmaniasis: Immune responses in protection and pathogenesis** *Nature Reviews Immunology*, 2016.

SILMON DE MONERRI, N. C.; KIM, K. Pathogens hijack the epigenome: A new twist on host-pathogen interactions. **American Journal of Pathology**, v. 184, n. 4, p. 897–911, 2014.

STÄGER, S. *et al.* Both interleukin-4 (IL-4) and IL-4 receptor α signaling contribute to the development of hepatic granulomas with optimal antileishmanial activity. **Infection and Immunity**, 2003.

SUNDAR, S.; JAYA, J. Liposomal amphotericin B and leishmaniasis: Dose and response. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 2, n. 2, p. 159, 2010.

TITUS, R. G. *et al.* A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. **Parasite Immunology**, 1985.

TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. **Immune response to leishmania: Paradox rather than paradigm** *FEMS Immunology and Medical Microbiology*, 2007.

VAN ZANDBERGEN, G. *et al.* Cutting Edge: Neutrophil Granulocyte Serves as a Vector for *Leishmania* Entry into Macrophages. **The Journal of Immunology**, v. 173, n. 11, p. 6521–6525, 2004.

VERMA, G. *et al.* Leishmaniasis : A Menace. v. 8, n. 3, p. 1–7, 2017.

VIJAYAKUMAR, S.; DAS, P. Recent progress in drug targets and inhibitors towards combating leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 181, p. 95–104, 2018.

WHA, R. *et al.* Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. n. 38, p. 557–572, 2017.

XIANG, Y. *et al.* JMJD3 is a histone H3K27 demethylase. **Cell Research**, v. 17, n. 10, p. 850–857, 2007.

YOO, K. H.; HENNIGHAUSEN, L. EZH2 methyltransferase and H3K27 methylation in breast cancer. **International Journal of Biological Sciences**, 2011.

ZULFIQAR, B.; SHELPER, T. B.; AVERY, V. M. Leishmaniasis drug discovery: recent progress and challenges in assay development. **Drug Discovery Today**, v. 22, n. 10, p. 1516–1531, 2017.

9 ANEXOS



LPG2 gene duplication in *Leishmania infantum*: a case for CRISPR-Cas9 gene editing

Flávio H. Jesus-Santos¹, Jessica Lobo-Silva¹, Pablo I. Ramos², Albert Descoteaux³, Jonilson B. Lima⁴, Valeria Borges¹, Leonardo P. Farias^{1*}

¹Gonçalo Moniz Institute (IGM), Brazil, ²Center for Data Integration and Knowledge for Health (CIDACS), Brazil, ³Centre de Recherche en Biotechnologie de la Santé Armand Frappier (INRS), Canada, ⁴Federal University of Western Bahia, Brazil

Submitted to Journal:
Frontiers in Cellular and Infection Microbiology

Specialty Section:
Microbes and Innate Immunity

Article type:
Brief Research Report Article

Manuscript ID:
522118

Received on:
20 Dec 2019

Frontiers website link:
www.frontiersin.org

1 **The antischistosomal potential of GSK-J4, an H3K27 demethylase**
2 **inhibitor: insights from molecular modeling, transcriptomics and *in***
3 ***vitro* assays**

4

5 Jessica Lobo-Silva^{1#}, Fernanda J. Cabral^{2#}, Murilo Sena Amaral³, Patrícia A. Miyasato⁴,
6 Rafaela Paula de Freitas⁴, Adriana S. A. Pereira^{3,5}, Mariana I. Khouri¹, Mayra M. F.
7 Barbosa⁶, Pablo Ivan Pereira Ramos⁷, Luciana C.C. Leite⁶, Oluwatoyin A. Asojo⁸,
8 Eliana Nakano⁴, Sergio Verjovski-Almeida^{3,5} and Leonardo Paiva Farias^{1*}

9

10 ¹Laboratório de Biomarcadores e Inflamação, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação
11 Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil

12 ²Departamento de Biologia Animal, Instituto de Biologia, Universidade Estadual de
13 Campinas, Campinas, SP, Brazil

14 ³Laboratório de Expressão Gênica em Eucariotos, Instituto Butantan, São Paulo, SP,
15 Brazil

16 ⁴Laboratório de Parasitologia, Instituto Butantan, São Paulo, SP, Brazil

17 ⁵Departamento de Bioquímica, Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São
18 Paulo, Brazil.

19 ⁶Laboratório Especial de Desenvolvimento de Vacinas, Instituto Butantan, São Paulo,
20 SP, Brazil

21 ⁷Centro de Integração de Dados e Conhecimentos para Saúde (CIDACS), Instituto
22 Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, Bahia, Brazil

23 ⁸Department of Chemistry and Biochemistry, Hampton University, Hampton VA, USA

24

25 * **Correspondence:** leonardo.farias@bahia.fiocruz.br