



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



**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**TESE DE DOUTORADO**

**INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NA AÇÃO  
LEISHMANICIDA DE INIBIDORES DA HSP90**

**LUANA CARNEIRO PALMA GONÇALVES**

**Salvador - Bahia**

**2021**

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

**Curso de Pós-Graduação em Patologia**

**INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NA AÇÃO  
LEISHMANICIDA DE INIBIDORES DA HSP90**

**LUANA CARNEIRO PALMA GONÇALVES**

Orientação: Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras

Co-orientação: Dra. Juliana Perrone Bezerra de Menezes Fullam

Tese de Doutorado apresentada ao  
Curso de Pós-graduação em Patologia  
requisito parcial para obtenção do grau  
de Doutor.

**Salvador - Bahia**

**2021**

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

Gonçalves, Luana Carneiro Palma.

G635i Investigação de mecanismos envolvidos na ação leishmanicida de inibidores da Hsp90.

/ Luana Carneiro Palma Gonçalves. - 2021.

128f. : il. ; 30 cm.

Orientador: Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras, Laboratório de Interação  
Parasito-Hospedeiro e Epidemiologia.

Tese (Doutorado em Patologia Humana e Experimental) – Faculdade de  
Medicina, Universidade Federal da Bahia, Instituto Gonçalo Moniz, Fundação  
Oswaldo Cruz, 2021.

1. Leishmaniose. 2. Parasitos. 3. Macrófagos. 4. Parasitos. I. Título.

CDU 616.993.161

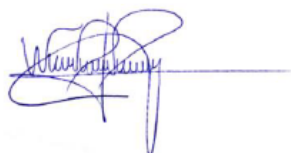
**: “INVESTIGAÇÃO DE MECANISMOS ENVOLVIDOS NA AÇÃO  
LEISHMANICIDA DE INIBIDORES DA HSP90”.**

**Luana Carneiro Palma Gonçalves**

**FOLHA DE APROVAÇÃO**

Salvador, 30 de junho de 2021

COMISSÃO EXAMINADORA



---

**Dr. Wander Rogério Pavanelli**  
Professor  
UEL



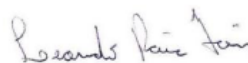
---

**Dr. Vinícius Pinto Costa Rocha**  
Especialista  
SENAI/CIMATEC



---

**Dra. Camila Indiani de Oliveira**  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ



---

**Dr. Leonardo Paiva Farias**  
Pesquisador  
IGM/FIOCRUZ



---

**Dra. Patrícia Sampaio Tavares Veras**  
Pesquisadora  
IGM/FIOCRUZ

## **FONTES DE FINANCIAMENTO**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001, do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico- CNPq (Universal – 422867/2016-0 e Bolsa de doutorado - 140455/2016-7).

Aos meus pais, Conceição e Carlos, por todo amor e pelo apoio incondicional.

Ao meu marido Robson, pelo amor e incentivo.

## AGRADECIMENTOS

À Dra. Patrícia Veras, por todos os ensinamentos, pela orientação criteriosa, contribuição na formação desde a iniciação científica e também pela amizade;

À Dra. Juliana de Menezes, pela coorientação, apoio no desenvolvimento deste trabalho e amizade;

Ao Instituto Gonçalo Moniz (Fiocruz – BA) e todo recurso humano, assim como ao Laboratório de Interação Parasito-Hospedeiro e Epidemiologia (LaIPHE) pelo apoio, estrutura e materiais para desenvolvimento da pesquisa;

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento do trabalho e pela bolsa de doutorado;

À Dra. Beatriz Dias, pela amizade e pelo apoio em todas as horas;

À Brenda Melo, pelo auxílio no desenvolvimento dos experimentos;

Ao Dr. Dario Zamboni, Dra. Catarina Horta e Dr. Jonilson Berlink pela colaboração e presteza;

Ao Dr. Marcelo Zaldini, Dr. Luiz Felipe Ferreira, Dr. Diogo Moreira, Msc. Helenita Quadros pela colaboração nos estudos *in silico* e de atividade enzimática;

Ao Dr. Osvaldo Pompílio e Wagner Tenório pela colaboração e ensinamentos;

Aos pesquisadores e estudantes do LaIPHE pela amizade e pelo auxílio no desenvolvimento das atividades;

À Sra Fiscina Sampaio, pela correção da tese e disponibilidade, assim como todos os funcionários da biblioteca do IGM;

Aos meus pais, Conceição e Carlos, pelo amor incondicional e apoio constante;

Ao meu marido Robson, pelo amor, apoio e incentivo em todas as horas;

Aos familiares Dilze, Edmario, Ingrid e Thaiz pela amizade e por todo apoio em Salvador;

A todos familiares e amigos que participaram, direta e indiretamente, dessa conquista.

GONÇALVES, Luana Carneiro Palma. Investigação de mecanismos envolvidos na ação leishmanicida de inibidores da Hsp90. 2021. 128 f. Tese (Doutorado em Patologia Humana e Experimental) – Universidade Federal da Bahia. Instituto Gonçalo Moniz, Fundação Oswaldo Cruz, Salvador, 2021

## RESUMO

**INTRODUÇÃO** A leishmaniose é uma doença infecciosa causada por parasitos protozoários do gênero *Leishmania*. Independente da manifestação clínica da doença, o tratamento convencional é baseado principalmente no uso de antimoniais pentavalentes e anfotericina B. Entretanto, tais drogas exibem alta toxicidade, efeitos colaterais graves e administração prolongada. Desse modo, a busca por compostos mais eficazes e menos tóxicos para o tratamento da leishmaniose é emergencial. Neste contexto, os inibidores da Hsp90 têm sido estudados para o tratamento da leishmaniose, entre eles, os inibidores da família da geldanamicina (GA). Estudos demonstraram que o 17-N-alil amino 17-demetoxi geldanamicina (17-AAG) foi capaz de reduzir em 90% o percentual de macrófagos infectados por *L. amazonensis*, assim como o número de parasitos intracelulares. Esse efeito ocorreu em doses que não foram tóxicas para o macrófago, que é célula hospedeira para *Leishmania* spp. Apesar das evidências do efeito leishmanicida desses inibidores, pouco se sabe como atuam durante a infecção por *Leishmania*. Assim, para desenvolvimento de um esquema terapêutico ideal para a leishmaniose, por meio do uso de inibidores da Hsp90, a compreensão dos mecanismos envolvidos na ação leishmanicida desses compostos é fundamental. **OBJETIVOS** O objetivo do presente trabalho foi investigar possíveis mecanismos de ação de inibidores da Hsp90, incluindo GA, 17-AAG e 17-dimetil-amino-etil amino-17-demetoxi geldanamicina (17-DMAG), sobre a morte de *Leishmania*. Nessa tese focamos principalmente no composto hidrossolúvel 17-DMAG. Nossa hipótese é que os inibidores de Hsp90 teriam um efeito duplo, direto sobre a *Leishmania*, assim como sobre a célula hospedeira, modulando a resposta inata, facilitando a morte intracelular de *L. amazonensis*. Assim, a eficácia em matar o parasito em concentrações não tóxicas para o macrófago poderia estar relacionada a uma maior afinidade dos inibidores da família da GA pela Hsp90 do parasito em comparação a sua afinidade pela Hsp90 da célula hospedeira, resultante de possíveis diferenças estruturais e funcionais entre os ortólogos de Hsp90, Hsp83 de *Leishmania* e Hsp90 da célula hospedeira. Além disso, hipotetizamos que inibidores da família da GA poderiam contribuir para a morte do parasito por meio de ativação do inflamassoma. **MATERIAL E MÉTODOS** Para avaliação do efeito direto do inibidor, inicialmente, avaliamos a toxicidade de *L. amazonensis* e da célula hospedeira aos inibidores GA, 17-AAG e 17-DMAG. Em seguida, utilizando uma abordagem *in silico*, avaliamos as interações presentes entre GA, 17-AAG e 17-DMAG e Hsp83 de *L. amazonensis* ou Hsp90 humana, e a partir de análises de *docking*, foi calculada a intensidade destas interações. Posteriormente, foi avaliado o efeito do inibidor de Hsp90, 17-DMAG, na modulação da resposta imune da célula hospedeira, especificamente na ativação do inflamassoma, a partir da avaliação da produção de IL-1 $\beta$  e da influência de NLRP3 na morte do parasito, por meio da avaliação do percentual de infecção e viabilidade intracelular do parasito em macrófagos NLRP3<sup>-/-</sup>. **RESULTADOS** *L. amazonensis* foi mais sensível aos inibidores GA, 17-AAG e 17-DMAG do que a célula hospedeira, com os inibidores apresentando índices de seletividade de 266, 113 e 123, respectivamente. Os dados das análises *in silico* mostraram predominância de ligações de hidrogênio mediadas por moléculas de água na interação entre os



inibidores e Hsp90 humana, enquanto que, ligações diretas de hidrogênio foram observadas entre os inibidores e Hsp83 de *L. amazonensis*. Em seguida, foi observado que GA, 17-AAG e 17-DMAG tendem a se ligar com maior intensidade a Hsp83 de *L. amazonensis* do que Hsp90 humana, o que pode estar relacionado às ligações diretas de hidrogênio presentes entre inibidores e Hsp83 de *L. amazonensis*. Em relação ao efeito do inibidor na célula hospedeira, os dados mostraram que células infectadas tratadas com 17-DMAG apresentaram níveis elevados de IL-1 $\beta$  quando comparados com células infectadas não tratadas, sugerindo ativação do inflamassoma. Entretanto, em macrófagos com inibição de caspase 1 e em macrófagos de camundongos C57BL6 NLRP3<sup>-/-</sup> a morte do parasito induzida por 17-DMAG não foi alterada, sugerindo que o inflamassoma NLRP3 não tem influência sobre o efeito leishmanicida desse inibidor da Hsp90. **CONCLUSÃO** Nesta tese apresentamos evidências que o 17-DMAG tem efeito direto na morte de *Leishmania*, o que pode ser explicado pela maior tendência de ligação entre o inibidor e Hsp83 do parasito do que Hsp90 humana. Estudos serão futuramente conduzidos para esclarecer se a produção de IL-1 $\beta$  em macrófagos tratados com 17-DMAG influencia na morte de *L. amazonensis* em macrófagos infectados e tratados por 17-DMAG.

Palavras-chave: *Leishmania*, Hsp90, 17-DMAG

GONÇALVES, Luana Carneiro Palma. Investigation of mechanisms involved in the leishmanicidal action of Hsp90 inhibitors. 2021. 128 f. Thesis (Doctorate in Human and Experimental Pathology) - Federal University of Bahia. Gonçalo Moniz Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Salvador, 2021

## ABSTRACT

**INTRODUCTION** Leishmaniasis is an infectious disease caused by protozoan parasites of genus *Leishmania*. Regardless of the clinical manifestation of the disease, conventional treatment is mainly based on the use of pentavalent antimonials and amphotericin B. However, these drugs exhibit high toxicity, severe side effects and prolonged administration. Thus, the search for more effective and less toxic compounds for the treatment of leishmaniasis is urgent. In this context, Hsp90 inhibitors have been studied for the treatment of leishmaniasis, including inhibitors of the geldanamycin (GA) family. Studies have shown that 17-N-allyl amino 17-demethoxy geldanamycin (17-AAG) was able to reduce by 90% the percentage of macrophages infected by *L. amazonensis*, as well as the number of intracellular parasites. This effect occurred at doses that were not toxic to the macrophage, host cell for *Leishmania* spp. Despite evidence of the leishmanicidal effect of these inhibitors, little is known about how they act during *Leishmania* infection. Thus, to develop an ideal therapeutic scheme for leishmaniasis based on Hsp90 inhibitors, understanding the mechanisms involved in the leishmanicidal action of these compounds is essential. **OBJECTIVES** Thus, the aim of the present work was to identify possible mechanisms of action of Hsp90 inhibitors, including GA, 17-AAG and 17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxy geldanamycin (17-DMAG), on the *Leishmania amazonensis* death. In the present thesis we focused on the water soluble compound 17-DMAG. Our hypothesis is that Hsp90 inhibitors would have a double effect, a direct effect on *Leishmania* as on the host cell, modulating the innate immune response, facilitating the intracellular death of *L. amazonensis*. Thus, the great efficacy of these compounds in killing *Leishmania* parasites in non-toxic concentrations to macrophages could be related to a greater affinity of the inhibitors of the GA family inhibitors for the Hsp90 of the parasite compared to their affinity for the Hsp90 of the host cell. This higher affinity would be the result of possible structural and functional differences between the Hsp90 orthologues, Hsp83 of *Leishmania* and Hsp90 of the host cell. Furthermore, we hypothesized that inhibitors of the GA family could contribute to parasite death through inflammasome activation. **MATERIAL AND METHODS** To evaluate the direct effect of the inhibitor, we initially evaluated the *L. amazonensis* and host cell toxicity to inhibitors, GA, 17-AAG and 17-DMAG. Then, using an *in silico* approach, we evaluated the interactions present between GA, 17-AAG and 17-DMAG and *L. amazonensis* Hsp83 or human Hsp90, and calculated the interaction intensities, by docking analysis. Subsequently, the effect of the Hsp90 inhibitor, 17-DMAG, on the modulation of the host cell's immune response, specifically on the activation of the inflammasome, was evaluated by IL-1 $\beta$  production and influence of NLRP3 in death parasite, evaluating percentual of infection and parasite intracellular viability in macrophages NLRP3<sup>-/-</sup>. **RESULTS** We observed that *L. amazonensis* was more sensitive to Hsp90 inhibitors than the host cell, showing values of selectivity index of 266, 113 e 123, respectively. Data showed a predominance of hydrogen bonds mediated by water molecules in the interaction between the inhibitors and human Hsp90, while direct hydrogen bonds were observed between the inhibitors and Hsp83 of *L. amazonensis*. Then, from docking analysis, it was observed that GA, 17-AAG and 17-DMAG tend to bind more strongly

to *L. amazonensis* Hsp83 than to human Hsp90, which may be related to direct hydrogen bonds present between inhibitors and *L. amazonensis* Hsp83. We found that infected cells treated with 17-DMAG produced greater levels of IL-1 $\beta$  when compared to untreated infected cells, suggesting that inflammasome has been activated in response to Hsp90 inhibitor treatment. However, 17-DMAG-induced parasite death was not altered in cells treated with caspase 1 inhibitor in mouse macrophages and in C57BL6 NLRP3<sup>-/-</sup> mouse macrophages, suggesting that the NLRP3 inflammasome has no influence on the leishmanicidal effect of this Hsp90 inhibitor. **CONCLUSION** We presented evidence that 17-DMAG has a direct effect on the death of *Leishmania*, which can be explained by the greater tendency of binding between the inhibitor and Hsp83 of the parasite than human Hsp90. Studies need to be conducted in the future to clarify whether IL-1 $\beta$  production in 17-DMAG-treated macrophages influences the death of *L. amazonensis* in infected and 17-DMAG-treated macrophages.

Keywords: *Leishmania*, Hsp90, 17-DMAG

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES OU FIGURAS

<b>Figura 1</b> - Ciclo de vida do parasito.....	17
<b>Figura 2</b> - Regulação imune de macrófagos humanos durante infecção por <i>Leishmania</i> .....	20
<b>Figura 3</b> - Componentes do inflamassomo NLRP3 e seus domínios.....	22
<b>Figura 4</b> - Ativação do inflamassomo NLRP3 em resposta à infecção por <i>Leishmania</i> .....	23
<b>Figura 5</b> - Ciclo conformacional da Hsp90.....	27
<b>Figura 6</b> - Participação de co-chaperonas durante ciclo da Hsp90.....	28
<b>Figura 7</b> - Citotoxicidade dos inibidores de Hsp90, 17-AAG e 17-DMAG sobre células MRC-5.....	42
<b>Figura 8</b> - Citotoxicidade de inibidores da Hsp90 a células humanas THP-1 e <i>L. amazonensis</i> .....	43
<b>Figura 9</b> - Percentual de viabilidade celular das células humanas THP-1 e de <i>L. amazonensis</i> tratadas com inibidores da Hsp90.....	44
<b>Figura 10</b> - Viabilidade intracelular de <i>L. amazonensis</i> em células THP-1 infectadas e, posteriormente, tratadas com 17-DMAG.....	45
<b>Figura 11</b> - Sítio de ligação e tipos de interação da Hsp83 de <i>L. amazonensis</i> com os inibidores de Hsp90.....	46
<b>Figura 12</b> - Sítio de ligação e tipos de interação da Hsp90 humana com os inibidores de Hsp90.....	48
<b>Figura 13</b> - Efeito do 17-DMAG sobre o percentual de infecção de macrófagos NLRP3 <sup>-/-</sup> infectados por <i>L. amazonensis</i> .....	50
<b>Figura 14</b> - Efeito do 17-DMAG sobre a viabilidade intracelular de <i>L. amazonensis</i> em macrófagos NLRP3 <sup>-/-</sup> infectados.....	52
<b>Figura 15</b> - Efeito da inibição da caspase 1 sobre a produção de IL-1 $\beta$ em macrófagos infectados por <i>L. amazonensis</i> tratados com 17-DMAG.....	53
<b>Figura 16</b> - Efeito da inibição da caspase 1 sobre a viabilidade intracelular dos parasitos em macrófagos infectados por <i>L. amazonensis</i> e tratados com 17-DMAG.....	55
<b>Figura 17</b> - Efeito do 17-DMAG durante a infecção por <i>Leishmania</i> e seus possíveis mecanismos de ação.....	65

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1** - Configurações usadas para criar as 5 novas conformações para os inibidores HSP90, usando o programa Balloon.....38
- Tabela 2** - Scores ChemPLP para cada inibidor e suas respectivas conformações quando ligadas ao domínio N-terminal da Hsp83 de *L. amazonensis* ou Hsp90 humana.....49

## LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

17-AAG	17-N-alil amino 17-demetoxi geldanamicina
17-DMAG	17-dimetil amino etil amino-17-demetoxi geldanamicina
ATP	Adenosina trifosfato
BMMΦ	Macrófagos derivados de medula óssea
DAPI	4',6-Diamidino-2-fenilindole dihidroclorato
DNA	Ácido desoxirribonucleico
D.O.	Densidade óptica
EDTA	Ácido etilenodiamina tetracético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
GA	Geldanamicina
gp63	Glicoproteína de 63kDa
HEPES	N-2-hidroxietil piperazina-N'-2-etano-sulfônico
Hsp90	Proteína de choque térmico 90
IL-1β	Interleucina-1β
IL-18	Interleucina-18
IFN-γ	Interferon-gama
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarídeo
LTB <sub>4</sub>	Leucotrieno B <sub>4</sub>
M-CSF	Fator estimulador de colônia de macrófagos
NET	Armadilhas extracelulares de neutrófilos (do inglês <i>Neutrophil Extracellular Traps</i> )
NLRP3	<i>Nucleotide-binding and oligomerization domain-like receptor 3</i>
NO	Óxido nítrico
O <sub>2</sub> <sup>-</sup>	Superóxido
PBS	Tampão fosfato salino

PFA	Paraformaldeído
PMA	Forbol 12-miristato 13-acetato
PGE <sub>2</sub>	Prostaglandina E <sub>2</sub>
RPMI	<i>Roswell Park Memorial Institute</i>
ROS	Espécies reativas de oxigênio
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento beta
TLR	Receptores <i>Toll-like</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
WT	<i>Wild type</i>

# SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>15</b>
1.1	LEISHMANIOSE .....	15
1.2	PARASITO.....	16
1.3	RESPOSTA IMUNE DURANTE A INFECÇÃO POR <i>Leishmania</i> .....	17
1.4	INFLAMASSOMO .....	20
1.5	TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE .....	23
1.6	<i>HEAT SHOCK PROTEIN</i> 90 (HSP90) .....	25
1.7	INIBIDORES DA HSP90.....	28
1.8	INIBIDORES DA FAMÍLIA DA GA EM INFECÇÕES PARASITÁRIAS .....	31
<b>2</b>	<b>JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE</b> .....	<b>32</b>
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>33</b>
3.1	OBJETIVO GERAL.....	33
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	33
<b>4</b>	<b>METODOLOGIA</b> .....	<b>34</b>
4.1	PARASITOS .....	34
4.2	ANIMAIS.....	34
4.3	INIBIDORES DA HSP90.....	34
4.4	CULTIVO DE CÉLULAS THP-1 E CÉLULAS MRC-5.....	35
4.5	OBTENÇÃO E CULTURA DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA (BMMΦ).....	35
4.6	ENSAIO ANTI- <i>Leishmania</i> .....	35
4.7	ENSAIO DE CITOTOXICIDADE.....	36
4.8	ENSAIO DE VIABILIDADE INTRACELULAR .....	37
4.9	ABORDAGEM <i>IN SILICO</i> .....	37
4.10	AVALIAÇÃO DO EFEITO DO 17-DMAG NA ATIVAÇÃO DO INFLAMOSSOMA DURANTE INFECÇÃO POR <i>Leishmania</i> .....	39



4.10.1	<i>Avaliação do percentual de infecção em BMMΦ NLRP3<sup>-/-</sup> tratados com 17-DMAG</i> .....	39
4.10.2	<i>Avaliação da viabilidade intracelular de L. amazonensis em BMMΦ NLRP3<sup>-/-</sup> tratados com 17-DMAG</i> .....	39
4.10.3	<i>Avaliação da produção de IL-1β em BMMΦ infectados e tratados com 17-DMAG</i> .....	40
4.10.4	<i>Avaliação do efeito da inibição de caspase 1 na viabilidade intracelular de L. amazonensis em BMMΦ tratados com 17-DMAG</i> .....	40
5	<b>RESULTADOS</b> .....	41
5.1	CITOTOXICIDADE DE INIBIDORES DA HSP90 CONTRA CÉLULAS DE MAMÍFERO E PARASITOS .....	41
5.1.1	<i>Células MRC-5</i> .....	41
5.1.2	<i>Células humanas THP-1 e L. amazonensis</i> .....	42
5.2	EFEITO CITOTÓXICO DO INIBIDOR DA HSP90, 17-DMAG, CONTRA AS FORMAS AMASTIGOTAS DE <i>L. amazonensis</i> .....	44
5.3	INTERAÇÕES DOS INIBIDORES DE HSP90, GA, 17-AAG E 17-DMAG, COM HSP83 DE <i>L. amazonensis</i> OU HSP90 HUMANA.....	45
5.4	EFEITO DO 17-DMAG NA ATIVAÇÃO DO INFLAMASSOMA EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR <i>Leishmania</i> .....	49
5.4.1	<i>Influência do inflamassoma NLRP3 sobre o tratamento por 17-DMAG de macrófagos infectados por L. amazonensis</i> .....	49
5.4.2	<i>Efeito do 17-DMAG sobre a viabilidade intracelular de L. amazonensis em macrófagos NLRP3<sup>-/-</sup> infectados</i> .....	51
5.4.3	<i>Efeito da inibição da caspase 1 sobre a produção de IL-1β em macrófagos infectados por L. amazonensis e tratados com 17-DMAG</i> ..	52
5.4.4	<i>Efeito da inibição da caspase 1 sobre a viabilidade intracelular dos parasitos em macrófagos infectados por L. amazonensis e tratados com 17-DMAG</i> .....	53
6	<b>DISCUSSÃO</b> .....	56
7	<b>CONCLUSÃO</b> .....	66
	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	67
	<b>APÊNDICE</b> .....	77

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 LEISHMANIOSE

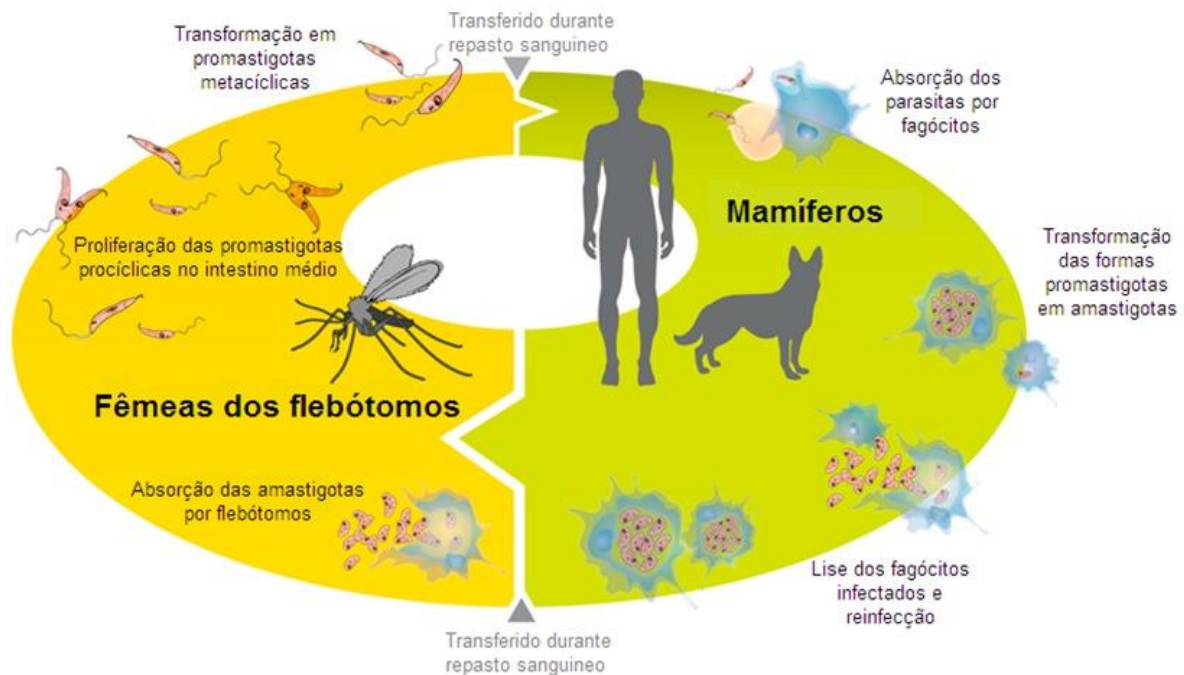
A leishmaniose é uma doença crônica infecciosa causada por parasitos protozoários do gênero *Leishmania*, os quais, geralmente, são transmitidos ao hospedeiro mamífero por meio da picada de insetos flebotomíneos infectados (BAILEY e LOCKWOOD, 2007). A leishmaniose é considerada uma doença negligenciada e está amplamente distribuída ao redor do mundo, sendo endêmica em 98 países (WHO, 2020). Mundialmente, estima-se que um bilhão de indivíduos esteja em áreas de risco para infecção por *Leishmania* (WHO, 2016). Dependendo da espécie do parasito, a doença causada pode se apresentar em duas formas clínicas principais: visceral e tegumentar, com manifestações cutânea localizada, mucocutânea, cutânea disseminada e cutânea difusa (PISCOPO e MALLIA AZZOPARDI, 2007). Globalmente, a cada ano, ocorrem de 200 a 400 mil novos casos de leishmaniose visceral, enquanto, para leishmaniose cutânea ocorrem de 700 mil a 1,2 milhão de casos. No Brasil, em levantamento recente feito pela Organização Pan-Americana da Saúde, somente em 2017, foram registrados 17.526 novos casos de leishmaniose cutânea e mucosa (PAHO/WHO, 2019).

A leishmaniose visceral, a forma mais grave da doença, é uma infecção sistêmica, caracterizada pela presença de febre, hepatoesplenomegalia, anemia e leucopenia (MANSON-BAHR, 1961) e as espécies de *Leishmania* que causam a leishmaniose visceral são *L. donovani* e *L. chagasi/L. infantum* (MURRAY, 2001). A leishmaniose cutânea é causada, principalmente, por *Leishmania tropica*, *L. major* e *L. aethiopica* (Velho Mundo) e por *L. braziliensis*, *L. mexicana* e *L. amazonensis* (Novo Mundo). Já a leishmaniose mucocutânea é causada, geralmente, por *L. braziliensis* e *L. guyanensis* (BURZA et al., 2018). A leishmaniose cutânea localizada é caracterizada pela presença de lesão papular (única ou em número limitado) na pele das áreas mais expostas do corpo, que pode evoluir para úlcera de borda elevada e fundo granuloso. Tais lesões podem se curar espontaneamente ou podem progredir, se tornando nodulares. Em alguns casos, a leishmaniose cutânea localizada pode evoluir para a leishmaniose cutânea difusa, caracterizada pela presença de múltiplas lesões nodulares não ulceradas, as quais apresentam muitos parasitos (SCORZA et al, 2017). Essa intensa proliferação dos parasitos está relacionada à ausência de resposta imune celular específica aos antígenos de *Leishmania*. No Brasil, a

leishmaniose cutânea difusa está associada exclusivamente à infecção causada por *L. amazonensis* (BRASIL, 2017). Já a leishmaniose cutânea disseminada é caracterizada pela presença de numerosas lesões papulares/acneiformes em mais de duas áreas não contíguas do corpo, com pequeno número de parasitos (SCORZA et al, 2017). Os indivíduos que apresentam essa manifestação, geralmente, são capazes de montar uma resposta imune celular e apresentam boa resposta terapêutica (BRASIL, 2017). Na leishmaniose mucocutânea, observa-se disseminação da infecção, que pode ser originária de uma lesão primária cutânea para regiões mucosas como nariz, lábios e palato, resultando em lesões desfigurantes (SCORZA et al, 2017).

## 1.2 PARASITO

Os parasitos do gênero *Leishmania* são dimórficos, se apresentando nas formas amastigotas e promastigotas. As formas promastigotas são alongadas, apresentam longo flagelo externo, medem entre 15-30  $\mu\text{m}$  por 2-3  $\mu\text{m}$  e vivem no trato alimentar do inseto vetor (DEDET et al., 1999), enquanto que as formas amastigotas são intracelulares, arredondadas, apresentando flagelo localizado na bolsa flagelar, medem entre 2-6  $\mu\text{m}$  de diâmetro e vivem em vacúolos parasitóforos de células hospedeiras. Durante o repasto sanguíneo do flebótomo infectado, os parasitos na sua forma promastigota metacíclica são inoculados na pele do hospedeiro e, posteriormente, internalizados pelos fagócitos da derme. No interior destes, os parasitos são transformados em sua forma amastigota e se multiplicam, levando à lise dos fagócitos e infecção de outras células. O ciclo continua quando, durante o repasto sanguíneo, o flebótomo ingere macrófagos infectados por *Leishmania*, os quais são lisados, liberando os parasitos na sua forma amastigota no estômago do vetor. Rapidamente, as formas amastigotas se transformam em formas promastigotas, as quais se direcionam ao trato alimentar do flebótomo, onde se multiplicam por fissão binária e atingem a fase metacíclica. Após atingirem a fase metacíclica, os parasitos migram para a probóscide e, no próximo repasto sanguíneo, o flebótomo infecta outro indivíduo (Fig. 1) (PULVERTAFT e HOYLE, 1960; GUEVARA *et al.*, 2001; SACKS e KAMHAWI, 2001).



**Figura 1. Ciclo de vida do parasito** (Traduzido de Veras & Menezes, 2016). Durante o repasto sanguíneo realizado pelo flebótomo infectado, as formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* são inoculadas na derme do hospedeiro mamífero e, em seguida, fagocitadas. No interior dos fagócitos as promastigotas se transformam em amastigotas e se multiplicam. Os fagócitos são lisados e os parasitos infectam outras células, que serão transferidas para o hospedeiro invertebrado durante o repasto sanguíneo. As amastigotas liberadas no trato alimentar do flebótomo se transformam em promastigotas, as quais se multiplicam e são transferidas no próximo repasto sanguíneo.

### 1.3 RESPOSTA IMUNE DURANTE A INFECÇÃO POR *Leishmania*

A resposta imune do hospedeiro à infecção por *Leishmania* se inicia no momento da inoculação das promastigotas metacíclicas na derme do hospedeiro. Durante o repasto sanguíneo, o flebótomo libera, além dos parasitos, a saliva. Os parasitos, juntamente com os componentes da saliva, induzem o rápido recrutamento de neutrófilos, as primeiras células a chegarem ao local da infecção, assim como de macrófagos (PETERS et al, 2008; TEIXEIRA et al, 2005). Além disso, mediadores lipídicos produzidos pelos macrófagos, como leucotrieno B<sub>4</sub> (LTB<sub>4</sub>) e prostaglandina E<sub>2</sub> (PGE<sub>2</sub>), podem intensificar o recrutamento de neutrófilos e macrófagos para o local da infecção (ARAÚJO-SANTOS et al, 2010). Foi demonstrado que o gel secretório produzido por promastigotas de *L. mexicana* e regurgitado pelo flebótomo durante o repasto sanguíneo, recruta macrófagos para o local da infecção (ROGERS et al, 2009).

Os neutrófilos são células centrais no controle inicial da disseminação do parasito. Após a infecção, promastigotas de *Leishmania* são rapidamente internalizados pelos neutrófilos (PETERS et al, 2008). A eliminação do parasito pelo

neutrófilo pode ocorrer por mecanismos intracelulares, por meio da produção de radicais de oxigênio, ou por mecanismos extracelulares, como a liberação de enzimas no espaço extracelular e emissão de NETs (do inglês *Neutrophil Extracellular Traps*) (VALÉRIO-BOLAS et al, 2019). As NETs são estruturas em “rede” constituídas por cromatina e proteínas granulares. Guimarães-Costa e colaboradores demonstraram que neutrófilos humanos emitiram NETs após interação com *L. amazonensis*, aprisionando e levando a morte do parasito (GUIMARÃES-COSTA et al, 2009). Apesar dos mecanismos efetores do neutrófilo que podem levar à morte de *Leishmania*, tais parasitos podem se estabelecerem no interior dos neutrófilos, que podem ser fagocitados pelo macrófago. Dessa forma, os parasitos são internalizados de uma forma silenciosa na célula hospedeira, levando o neutrófilo a ser considerado como “cavalo de Tróia” (LASKAY et al, 2003).

Além dos neutrófilos e suas funções no reconhecimento inicial e internalização dos parasitos, na fase seguinte há recrutamento dos macrófagos, as principais células hospedeiras de *Leishmania*. Os macrófagos participam da resposta imune inata e adquirida ao patógeno, por meio da ativação de mecanismos efetores que levam à morte do parasito, liberação de citocinas inflamatórias e apresentação de antígenos aos linfócitos T específicos (TOMIOTTO-PELLISSIER et al, 2018). A interação macrófago-*Leishmania* ocorre por meio de vários receptores presentes na superfície do macrófago, que estão envolvidos no reconhecimento e fagocitose de *Leishmania*, como receptores *Toll-like* (TLR), receptores para o complemento 1 e 3 (CR1 e CR3, respectivamente), receptores para a porção Fc de imunoglobulinas (receptores Fc) e receptores manose-fucose. Estes receptores interagem com moléculas presentes na superfície da *Leishmania*, como os lipofosfoglicanos (LPG), os quais estão ligados à membrana celular através de âncoras de glicofosfatidilinositol (GPI), e a glicoproteína de 63kDa (gp63) (CHAUHAN et al, 2017). Após o reconhecimento pelo macrófago, o parasito é internalizado e o vacúolo parasitóforo formado se funde com lisossomos, formando o fagolisossomo, onde o parasito, já na sua forma amastigota, se multiplica (MORADIN e DESCOTEAUX, 2012).

Na tentativa de eliminação do parasito, o macrófago apresenta diferentes mecanismos para controle da infecção. As espécies reativas de oxigênio (ROS), como o superóxido ( $O_2^-$ ) e o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ), são produzidas por macrófagos durante a fagocitose da *Leishmania*. Essas moléculas leishmanicidas

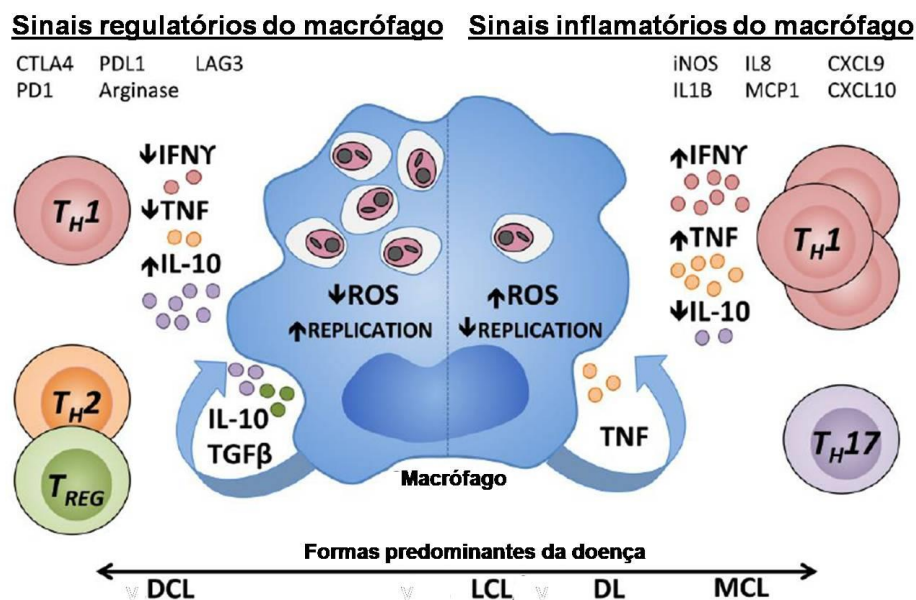
são produzidas via ativação do complexo NADPH oxidase na membrana de macrófagos (MILLER et al., 2000; GANTT et al., 2001; MUKBEL et al., 2007; ALMEIDA et al, 2012). Este complexo é formado pelo flavocitocromo  $b_{558}$ , componente ligado à membrana do fagossomo, e por quatro componentes citosólicos,  $p40^{phox}$ ,  $p47^{phox}$ ,  $p67^{phox}$  e a Rac GTPase (NAUSEEF, 2004). O complexo NADPH oxidase não está agrupado em células não ativadas, mas se agrupa na membrana após ativação do macrófago e, assim, coordena a formação de ROS (LODGE et al., 2006).

Além da produção de ROS, outro mecanismo efetor no controle da infecção por *Leishmania* é a produção de óxido nítrico (NO) (GOMES et al, 2003). O macrófago, quando estimulado pelas citocinas pró-inflamatórias interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) e o fator de necrose tumoral (TNF), é induzido a expressar óxido nítrico sintase induzível (iNOS), a qual produz o NO a partir da arginina. Essa ativação clássica do macrófago (denominado macrófago M1) é o mecanismo responsável pela atividade leishmanicida dependente de NO que, usualmente, leva ao controle do parasito. Por outro lado, o macrófago M2 (macrófago ativado alternativamente) ativa a via da arginina por meio da indução da expressão da arginase. A arginase hidrolisa a arginina em uréia e ornitina, sendo a última metabolizada em poliamina e prolina, que induzem proliferação celular, produção de colágeno e reparo tecidual. O macrófago M2 é estimulado por vários imunomoduladores, como o fator estimulador de colônia de macrófagos (M-CSF), interleucina-4 (IL-4) e IL-1 (GABRIEL et al, 2019). De forma geral, macrófagos M1 exibem um perfil pró-inflamatório, com atividade leishmanicida, enquanto que macrófagos M2 exibem perfil anti-inflamatório e regulatório, envolvidos na resolução do processo inflamatório e reparo. Assim, a polarização dos macrófagos em M1 ou M2 durante a infecção por *Leishmania* pode ser determinante no curso da doença (TOMIOTTO-PELLISSIER et al, 2018).

Scorza e colaboradores (2017) demonstraram como o balanço entre fatores pró e anti-inflamatórios pode se relacionar com o curso da infecção por *Leishmania*, nas diferentes formas tegumentares da doença (Fig. 2). Macrófagos M1 inibem a replicação de *Leishmania* dentro do fagolisossomo, tendo a participação de quimioatratores como IL-8, MCP1, CXCL9 e CXCL10, além da produção de IL-1 $\beta$ . No caso da leishmaniose mucocutânea, pode ser observado aumento das células Th17, que exarcebam a inflamação. Por outro lado, em um ambiente regulatório, com baixos níveis de citocinas tipo 1, ocorre redução da atividade microbicida dos

macrófagos. Além disso, as citocinas do tipo 2, IL-10 e TGF- $\beta$ , antagonizam os efeitos do IFN- $\gamma$  e TNF, e o aumento das poliaminas pode resultar na proliferação do parasito. Neste contexto, a atividade de arginase está associada à ativação alternativa de macrófagos do tipo M2. Adicionalmente, células T (CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>) com atividade imunorregulatória, chamadas células T<sub>REG</sub>, atuam suprimindo os efeitos do IFN- $\gamma$  (Fig. 2).

Como observado, a polarização do macrófago durante a infecção por *Leishmania* pode ser determinante no curso da doença. Um dos mecanismos relacionados à polarização de macrófagos M1, que apresentam perfil inflamatório e efetor, é a ativação do inflamassomo (LIN et al, 2018; SHEPPE et al, 2018).



**Figura 2. Regulação imune de macrófagos humanos durante infecção por *Leishmania*** (Traduzida de Scorza et al. 2017). O curso da infecção por *Leishmania* é resultante do balanço entre fatores pró e anti-inflamatórios. A presença de citocinas pró-inflamatórias, como IFN- $\gamma$  e TNF, em altos níveis, induzem a produção de ROS que contribuem para a eliminação do parasito. Por outro lado, em um ambiente regulatório, na presença de IL-10 e TGF- $\beta$ , e com menores níveis de IFN- $\gamma$  e TNF, ocorre redução da atividade microbicida do macrófago que pode favorecer a replicação do parasito.

#### 1.4 INFLAMASSOMO

O inflamassomo é um importante componente do sistema imune inato do hospedeiro em resposta a infecção por diferentes microorganismos (LIMA-JÚNIOR et al, 2013; MASCARENHAS e ZAMBONI, 2016; GONÇALVES et al, 2017). O inflamassomo é um complexo protéico multimérico formado por uma proteína sensora, uma proteína adaptadora e uma caspase inflamatória. Estes componentes

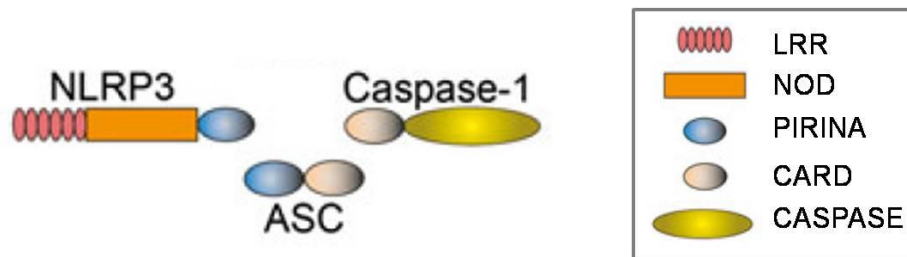
se agrupam no citoplasma da célula em resposta a diferentes estímulos, levando a ativação da caspase, que dirige a maturação de pro-IL-1 $\beta$  e pro-IL18 em IL-1 $\beta$  e IL18, respectivamente (MARTINON et al, 2002).

A especificidade do inflamassomo é definida pela sua proteína sensora que, em sua maioria, são receptores NLR [do inglês *NOD (nucleotide-binding and oligomerization domain)-like receptor*]. O principal inflamassomo envolvido durante a infecção por *Leishmania* é o NLRP3, formado pela proteína sensora NLRP3, pela proteína adaptadora ASC (do inglês *apoptosis-associated speck-like protein containing a caspase-recruitment domain*) e pela caspase-1 (Zamboni & Lima-Júnior, 2015) (Fig. 3). A proteína sensora NLRP3 é formada por três domínios: um domínio pirina na região amino-terminal, o domínio NOD central e um domínio LRR (*leucine-rich repeat*) na região carboxi-terminal (FRANCHI et al, 2009). Durante o agrupamento do inflamassomo, o domínio pirina da NLRP3 interage com o domínio pirina presente na ASC, que por sua vez interage com a caspase-1 através do domínio CARD (do inglês *caspase recruitment domain*) (VAJJHALA et al, 2012).

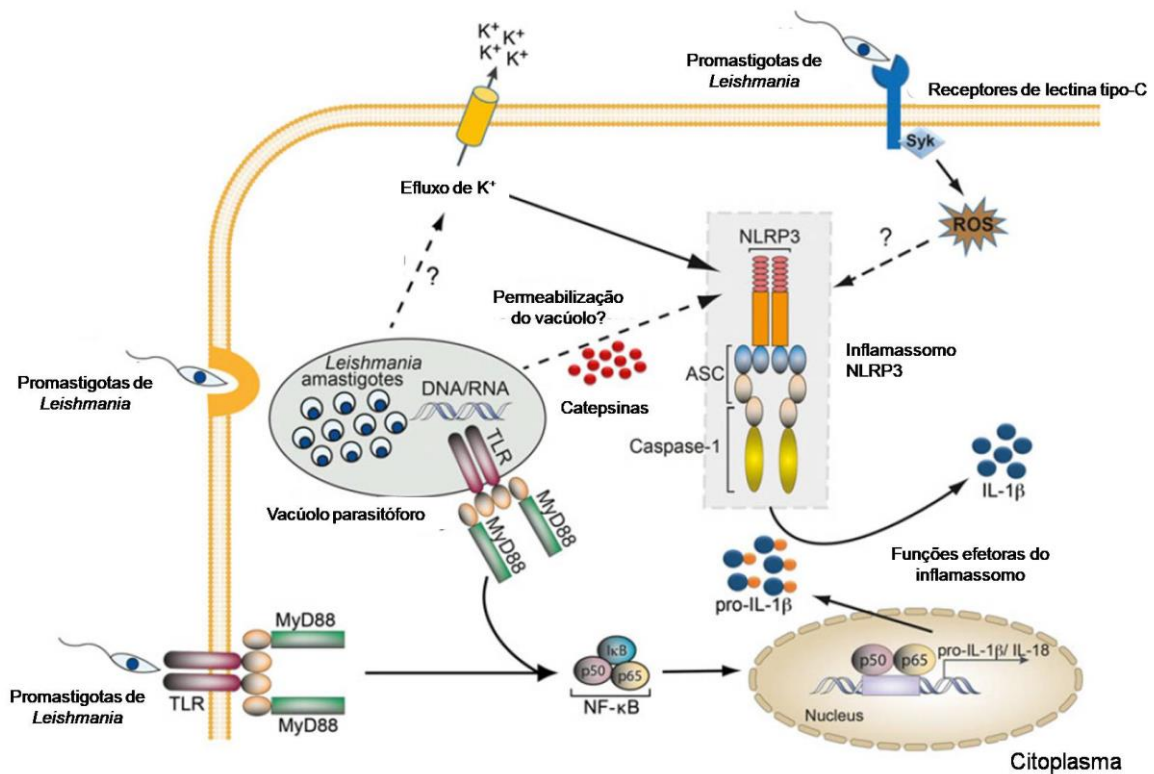
Os mecanismos que levam a ativação do inflamassomo não são completamente elucidados. Zamboni & Lima-Júnior (2015) demonstraram quais os mecanismos que podem estar envolvidos na ativação do inflamassomo durante a infecção por *Leishmania*. Inicialmente, a interação das promastigotas com a membrana plasmática da célula hospedeira, via TLR, ativa a molécula adaptadora MyD88, que leva a ativação de NF- $\kappa$ B, induzindo a transcrição de genes que codificam proteínas que compõem o inflamassomo, assim como os substratos pro-IL-1 $\beta$  e pro-IL-18. Sinais induzidos pelo parasito como o efluxo de K<sup>+</sup> e a liberação de catepsinas no citoplasma levam a ativação do inflamassomo, apesar dos mecanismos serem desconhecidos. Além disso, a produção de ROS, resultante da ligação do parasito com receptores lectina tipo C, como dectina-1 e receptores manose, também tem sido relacionada à ativação do inflamassoma NLRP3. Finalmente, após agrupamento dos componentes do inflamassomo, ocorre ativação da caspase-1 que cliva pro-IL-1 $\beta$  e pro-IL-18 em IL-1 $\beta$  e IL18 (Fig. 4). Lima-Júnior e colaboradores demonstraram que a inibição da NADPH oxidase e a ausência da dectina-1 reduziram a ativação do inflamassomo em macrófagos infectados por *L. amazonensis*, reforçando o papel dos ROS na ativação do inflamassomo (LIMA-JÚNIOR et al, 2017).



O papel do inflamassomo na restrição da replicação de *Leishmania* tem sido claramente descrito. Em estudo realizado com macrófagos de camundongos C57BL/6 infectados por *L. amazonensis*, foi observada ativação do inflamassomo NLRP3, que foi acompanhada de redução do percentual de infecção. Além disso, foi demonstrado que a produção de IL-1 $\beta$  dirigiu a síntese de NO, por meio da regulação transcricional do gene da iNOS, via MyD88 (LIMA-JÚNIOR et al, 2013). A síntese do NO como mecanismo efetor induzido pela ativação do inflamassomo também já foi descrito por Buzzo e colaboradores (BUZZO et al, 2010). Recentemente, em estudo realizado por De Carvalho e colaboradores, foi observado controle da infecção em macrófagos infectados por diferentes espécies de *Leishmania* e esse efeito foi relacionado à ativação da caspase-11, que dirigiu a ativação não-canônica do inflamassomo NLRP3 (DE CARVALHO et al, 2019). Em conjunto, os dados sugerem que a ativação do inflamassomo é um mecanismo importante no controle da infecção por *Leishmania*.



**Figura 3. Componentes do inflamassomo NLRP3 e seus domínios** (Adaptada de Zamboni & Lima-Júnior, 2015). O inflamassomo NLRP3 é composto pela proteína sensora NLRP3, a proteína adaptadora ASC e pela caspase-1. A proteína sensora NLRP3 apresenta um domínio LRR (*leucine-rich repeat*), um domínio NOD (*nucleotide-binding and oligomerization domain*) central e um domínio pirina. O domínio pirina de NLRP3 interage com o domínio pirina de ASC. A interação de ASC com a caspase-1 é mediada pelos domínios CARD (*caspase recruitment domain*) presentes em ambas as proteínas.



**Figura 4. Ativação do inflamassomo NLRP3 em resposta à infecção por *Leishmania*** (Traduzida de Zamboni & Lima-Júnior, 2015). A interação das promastigotas com TLR na superfície da célula, ativa MyD88, que desencadeia a ativação de NF- $\kappa$ B, que induz a transcrição de genes que codificam proteínas do inflamassomo e os substratos pro-IL-1 $\beta$  e pro-IL-18. A produção de ROS, o efluxo de K<sup>+</sup> e a liberação de catepsinas no citoplasma levam a ativação do inflamassomo. Finalmente, após agrupamento dos componentes do inflamassomo, ocorre ativação da caspase-1 que cliva pro-IL-1 $\beta$  e pro-IL-18 em IL-1 $\beta$  e IL18.

## 1.5 TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE

Independente da forma clínica, o tratamento da leishmaniose se baseia, principalmente, no uso de antimoniais pentavalentes e da anfotericina B. Os antimoniais pentavalentes são as drogas de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose, sendo as mais comuns o estilbogluconato de sódio (Pentostam®) e o antimoniato de meglumina (Glucantime®). Entretanto, tais drogas apresentam alta toxicidade e exibem vários efeitos colaterais como: náuseas, artralguas, dor de cabeça, dores musculares e abdominal, diarreia, febre, fadiga e arritmias (OLIVEIRA et al., 2011; SUNDAR e CHAKRAVARTY, 2013). Além dos efeitos colaterais, os antimoniais pentavalentes podem apresentar falha terapêutica. O tratamento com antimoniato de meglumina (20 mg/kg/dia durante 20 dias) em pacientes com lesão papular, infectados por *L. braziliensis*, apresentou falha terapêutica em 46% dos pacientes, os quais exibiram aumento e ulceração da lesão (MACHADO et al, 2002). Adicionalmente, diferentes espécies de *Leishmania* exibem variação na

sensibilidade aos antimoniais pentavalentes, o que leva a diferenças na resposta terapêutica a estas drogas (MENEZES et al, 2015). Em estudo conduzido em pacientes com leishmaniose cutânea, infectados por *L. braziliensis* ou *L. guyanensis*, e tratados com antimoniato de meglumina (20 mg/kg/dia durante 20 dias) foi observada uma baixa taxa de cura nos pacientes infectados por ambas espécies, entretanto o maior risco de falha terapêutica foi observado em pacientes infectados por *L. guyanensis* (ROMERO et al., 2001).

A anfotericina B também apresenta alta toxicidade quando administrada na sua forma livre (anfotericina B desoxicolato). Entre os efeitos colaterais observa-se nefrotoxicidade e miocardite (SAWAYA et al., 1995). Por apresentar menos efeitos colaterais, o tratamento com a anfotericina B lipossomal (AmBisome®) tem sido adotado em alguns países desenvolvidos, porém o alto custo inviabiliza seu uso em larga escala (CHAPPUIS et al., 2007). Em estudo realizado em pacientes com leishmaniose cutânea foi demonstrado que 84% dos pacientes apresentaram cura das lesões na pele após tratamento com anfotericina B lipossomal em regime de 3 mg/kg/dia durante 7 dias (WORTMANN et al., 2010). Aqui no Brasil, Machado e colaboradores demonstraram que o tratamento com anfotericina B lipossomal (dose total de 30 mg/kg) em pacientes com leishmaniose cutânea disseminada apresentou taxa de cura de 75% (MACHADO et al, 2015).

Nos anos 80, a miltefosina foi identificada como composto com atividade leishmanicida. A miltefosina apresenta como principal vantagem o fato de ser um tratamento administrado por via oral, entretanto, exibe potencial teratogênico, necessitando que mulheres em idade reprodutiva realizem a contracepção durante todo o tratamento (CROFT e OLLIARO, 2011). Apesar desse efeito, a miltefosina tem se mostrado eficaz no tratamento da leishmaniose. Em estudo comparativo, para avaliar a eficácia da miltefosina e do antimoniato de meglumina no tratamento de pacientes com leishmaniose cutânea, foi observado que a miltefosina apresentou taxa de cura de 75%, enquanto que, para o tratamento com antimoniato de meglumina, a taxa de cura foi de 53,3% (MACHADO et al, 2010).

A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídico, com atividade leishmanicida, utilizado no tratamento da leishmaniose visceral e cutânea, sob via de administração parenteral ou tópica, respectivamente (TIUMAN et al., 2011). Os efeitos adversos da administração parenteral da paromomicina incluem dor local, ototoxicidade e transaminite hepática (SUNDAR e SINGH, 2018). A pentamidina é

uma droga utilizada para tratamento da leishmaniose cutânea, principalmente em países endêmicos da América do Sul, e apresenta via de administração intramuscular (CROFT e OLLIARO, 2011). Essa droga exibe efeitos adversos como: náuseas, dor de cabeça, mialgia, tontura, hipotensão, dor e abcesso no local da injeção (SUNDAR e CHAKRAVARTY, 2015). Em estudo comparativo realizado em pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis*, 78% dos pacientes apresentaram cura da lesão quando tratados com o antimoniato de meglumina, enquanto que só 35% dos pacientes tratados com pentamidina apresentaram cura da lesão (ANDERSEN et al., 2005). Entretanto, em estudo realizado no Brasil por Amato et al. (2009), foi observado que a taxa de cura em pacientes com leishmaniose mucocutânea tratados com pentamidina foi de 91%, taxa similar ao observado em pacientes tratados com antimoniato de meglumina.

Apesar da monoterapia ser frequentemente utilizada, a terapia combinada de diferentes drogas tem sido adotada na tentativa de reduzir a toxicidade do tratamento convencional, assim como os casos de resistência. Para o tratamento da leishmaniose visceral na Índia, a combinação da anfotericina B lipossomal com miltefosina, anfotericina B lipossomal com paromomicina ou miltefosina com paromomicina tem sido adotada. Já no leste da África, a terapia combinada é feita com antimoniais pentavalentes e paromomicina (SUNDAR e SINGH, 2018).

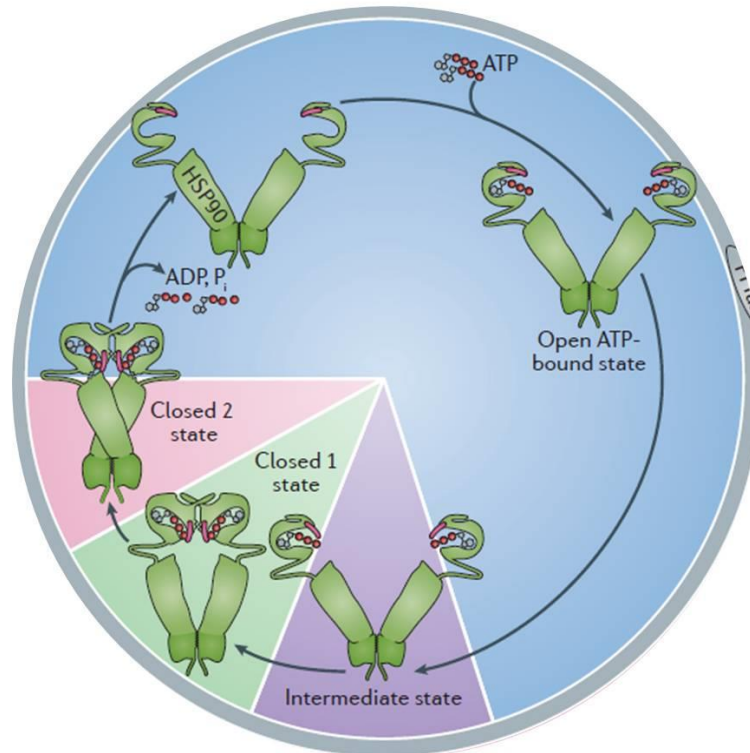
Em suma, as principais drogas disponíveis para o tratamento da leishmaniose apresentam alta toxicidade, efeitos colaterais severos, além de serem administradas por longos períodos, o que faz com que muitos pacientes desistam do tratamento (CROFT e COOMBS, 2003; CROFT e OLLIARO, 2011). Desse modo, a busca por alternativas eficazes e menos agressivas para o tratamento da leishmaniose é um tema prioritário.

## 1.6 HEAT SHOCK PROTEIN 90 (HSP90)

Os inibidores da *Heat Shock Protein 90* (Hsp90), utilizados em pesquisas para o tratamento contra o câncer, têm sido utilizados em estudos sobre leishmaniose (PETERSEN et al., 2012; SANTOS et al., 2014). A Hsp90 é uma chaperona molecular, altamente conservada, presente em eubactérias e em todos os eucariotos, o que reflete seu importante papel na manutenção e homeostase celular. Esta proteína tem como função auxiliar no correto enovelamento de suas proteínas cliente, as quais são envolvidas, principalmente, em vias de sinalização celular,

como fatores de transcrição e proteínas cinases (BROWN *et al.*, 2007). Estruturalmente, a Hsp90 é um homodímero em que cada monômero é formado por três domínios distintos: um domínio N-terminal (NTD), um domínio intermediário e um domínio C-terminal (CTD). O sítio de ligação da Hsp90 ao ATP localiza-se no NTD, onde o ATP se liga e é hidrolisado, levando à sua ativação. O domínio intermediário é o local de ligação das proteínas cliente, assim como de algumas co-chaperonas, que auxiliam a Hsp90. O CTD é o local responsável pela dimerização da Hsp90 e também está envolvido na ligação das co-chaperonas à Hsp90 (ZHAO e HOURY, 2005).

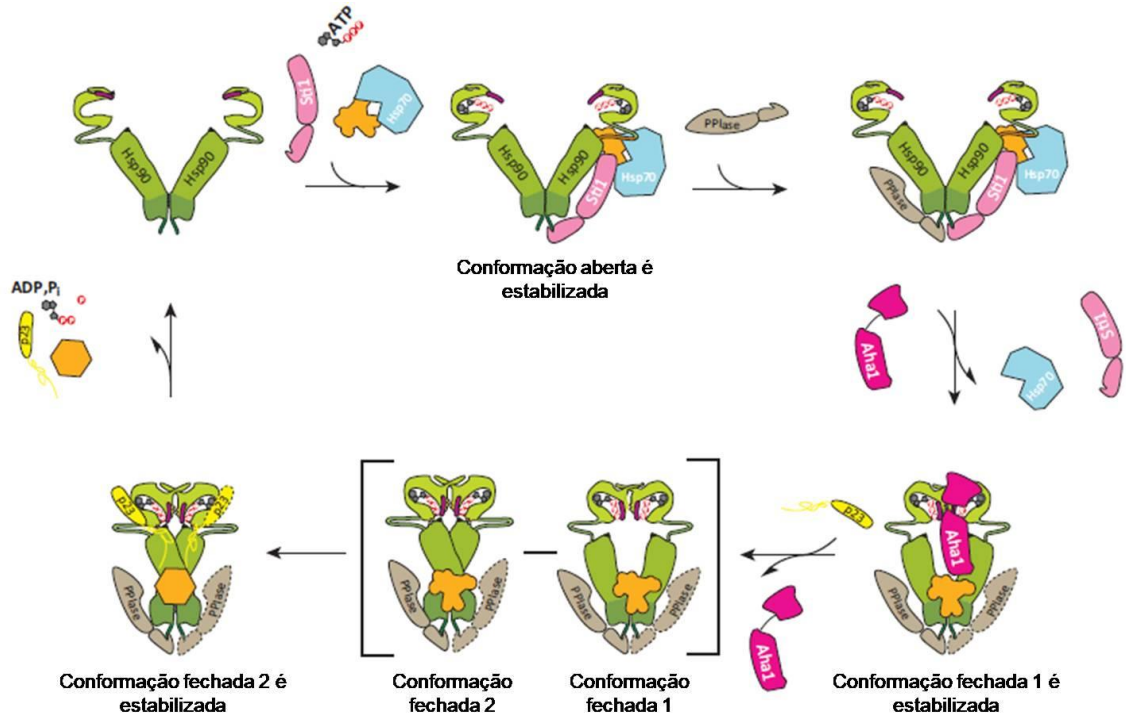
Durante seu ciclo conformacional, a Hsp90 ao se ligar ao ATP, sofre várias mudanças conformacionais (SCHOPF *et al.* 2017). Na ausência do ATP, a Hsp90 permanece em seu estado aberto. Entretanto, quando o ATP se liga ao NTD da Hsp90, mudanças conformacionais da proteína se iniciam. Após a ligação do ATP (estado aberto ligado ao ATP), o NTD sofre rearranjo, que promove fechamento da região *lid* (região contendo vários aminoácidos conservados), levando ao estado intermediário da Hsp90. Em seguida, os NTDs de cada monômero interagem e se dimerizam (estado fechado 1) e, posteriormente, os monômeros se torcem entre si, fazendo com que os NTDs se associem aos domínios intermediários da proteína (estado fechado 2). Essa associação faz com que o ATP seja hidrolisado em ADP e fosfato inorgânico (Pi), os quais são liberados e a Hsp90 volta ao seu estado aberto inicial (Fig. 5).



**Figura 5. Ciclo conformacional da Hsp90** (Schopf et al, 2017). O homodímero Hsp90 sofre várias mudanças conformacionais durante seu ciclo. Após a ligação do ATP (estado aberto ligado ao ATP), a Hsp90 sofre mudanças no domínio NTD e a região *lid* se fecha (estado intermediário). Em seguida, os NTDs dos monômeros se dimerizam (estado fechado 1) e ocorre a torção dos monômeros, aproximando os NTDs dos domínios intermediários (estado fechado 2). O ATP é hidrolisado, liberando ADP e Pi, e a Hsp90 volta ao seu estado aberto.

Durante esse ciclo, várias co-chaperonas se associam à Hsp90 em diferentes momentos e a auxiliam no dobramento das proteínas cliente (ROHL et al. 2013). Inicialmente, a co-chaperona Sti1/Hop (do inglês *stress inducible 1 / HSP70-HSP90 organizing protein*) se associa à Hsp90 no seu estado aberto, juntamente com a Hsp70, que carrega a proteína cliente. A ligação da Sti/Hop estabiliza o estado aberto e inibe a atividade ATPase da Hsp90. Posteriormente, ocorre a ligação da PPIase (do inglês *peptidyl-prolyl isomerase*), seguida da ligação da co-chaperona Aha 1 (do inglês *activator of heat shock protein 90 ATPase*), que enfraquece a ligação da Sti1/Hop, removendo-a juntamente com a Hsp70 e, dessa forma, levando a tomar a conformação fechada 1 da Hsp90. Por fim, a co-chaperona p23 se associa e causa o deslocamento da proteína Aha1, tomando a conformação fechada 2. O ATP é hidrolisado e depois as co-chaperonas e a proteína cliente são liberadas (Fig. 6). Como demonstrado acima, o ciclo funcional da Hsp90 é altamente coordenado e

dinâmico, e sua atividade pode ser modulada de diferentes modos, com a utilização de inibidores.



**Figura 6. Participação de co-chaperonas durante ciclo da Hsp90** (Traduzida de Rohl et al, 2013). A proteína cliente (laranja) ligada à Hsp70 se associa à Hsp90 com auxílio da co-chaperona Sti/Hop, que estabiliza a conformação aberta da Hsp90. A PPIase se liga ao complexo e, em seguida a Aha1 se associa, estabilizando a conformação fechada 1. Posteriormente, a co-chaperona p23 se liga à Hsp90, levando a conformação fechada 2, o ATP é hidrolisado, liberando ADP e Pi, assim como a proteína cliente já na sua conformação ativa.

### 1.7 INIBIDORES DA HSP90

A inibição da Hsp90 tem consequências drásticas na célula, pois leva à formação de proteínas cliente mal dobradas que, em última instância, serão degradadas via proteassomo, interferindo no crescimento e sobrevivência celular (THEODORAKI e CAPLAN, 2012). Existem diversos inibidores da atividade da Hsp90, os quais podem atuar diretamente, por meio da ligação à Hsp90, ou, indiretamente, pela inibição de co-chaperonas que auxiliam a Hsp90 (SIDERA e PATSAVOUDI, 2014). Os inibidores que se ligam diretamente à Hsp90 podem se ligar em domínios diferentes da proteína. Os mais estudados são os inibidores que se ligam ao NTD. Esses inibidores atuam por meio da competição pelo sítio de ligação ao ATP presente no NTD, inibindo assim a ligação e hidrólise do ATP, fundamentais para a atividade da Hsp90 (SHRESTHA et al, 2016).

O radicicol é um composto natural que se liga ao NTD da Hsp90. O radicicol é um antibiótico macrocíclico, produzido pelo fungo *Monosporium bonorden*, que apresenta atividade antitumoral *in vitro* (ZHAO et al, 1995; KWON et al, 1997). Entretanto, devido ao fato da sua atividade *in vitro* não ser observada *in vivo*, vários outros análogos foram sintetizados a partir do radicicol, como o KF55823, o KF25706 e o radester (SOGA et al, 1999; SHEN e BLAGG, 2005). Além dos compostos naturais e seus análogos, inibidores sintéticos de Hsp90 foram desenhados a partir de estudos da estrutura cristalina da interação ATP/Hsp90. O PU3 foi desenvolvido por Chiosis e colaboradores e apresenta em sua estrutura um “esqueleto” composto de purina (*purine scaffold*), que interage com o sítio de ligação do ATP (CHIOSIS et al, 2001). A partir da otimização do PU3, vários inibidores foram desenvolvidos, como o BIIB021/CNF2024, MPC-3100, PU-H71 e o CUDC-305 (LUNDGREN et al, 2009; KIM et al, 2012; TRENDOWSKI, 2015). Outro grupo de inibidores sintéticos, que se ligam ao NTD da Hsp90, inclui os inibidores que apresentam em sua estrutura núcleo pirazol ou isoxazol, como CCT018159, VER-49009 e NVP-AUY922 (SIDERA e PATSAVOUDI, 2014). Além do NTD, a ligação dos inibidores à Hsp90 pode ser realizada por meio do CTD. A novobiocina é um antibiótico cumarínico que se liga a um sítio secundário de ligação do ATP presente no CTD da Hsp90 e impede a ligação de co-chaperonas, induzindo a degradação de proteínas cliente (DONNELLY e BLAGG, 2008).

A inibição da atividade da Hsp90 também pode ser realizada de maneira indireta, por meio da inibição da interação entre Hsp90 e co-chaperonas. Foi demonstrado que os inibidores celastrol e a gedunina são capazes de inativar a co-chaperona p23, a qual está envolvida na estabilização do estado fechado 2 da Hsp90 durante seu ciclo (CHADLI et al, 2010; PATWARDHAN et al, 2013). A co-chaperona Hop, que estabiliza o estado aberto da Hsp90 e inibe a atividade ATPase no início do ciclo, é impedida de se ligar ao CTD da Hsp90 pela molécula CTPR390+, a qual mimetiza o domínio tetratricopeptídeo presente na Hop (CORTAJARENA et al, 2008).

A geldanamicina (GA) foi o primeiro inibidor da Hsp90 a ser descoberto, pela sua atividade anticancerígena. Em estudo para avaliar compostos com atividade antitumoral, foi observado que a GA alterou o fenótipo de células neoplásicas (células NRK transformadas com o oncovírus do sarcoma de Rous, que expressam p60<sup>src</sup>, proteína responsável pelos eventos oncogênicos) para um fenótipo normal.



Além disso, foi demonstrado que a GA diminuiu os níveis da p60<sup>src</sup> e que a GA não teve efeito direto na atividade da p60<sup>src</sup> (UEHARA et al, 1986). O alvo da GA até então não era conhecido. Entretanto, quase uma década depois, Whitesell e colaboradores demonstraram que a GA foi capaz de se ligar à Hsp90, de modo estável e específico, e que esse composto inibiu a formação do complexo Hsp90/src, tornando a Hsp90 um alvo com potencial para modulação (WHITESELL et al, 1994). O composto natural GA é uma ansamicina benzoquinona obtida a partir da fermentação da bactéria *Streptomyces hygroscopicus*. Quimicamente, a GA é formada por uma estrutura macrocíclica planar ligada a uma porção quinona. A GA se liga diretamente a Hsp90, mais especificamente, ao local de ligação do ATP presente no NTD da proteína (WHITESELL et al., 1994; PRODROMOU et al., 1997; STEBBINS et al., 1997). A partir da GA foram sintetizados os análogos 17-N-alil amino 17-demetoxi geldanamicina (17-AAG) e o 17-dimetil amino etil amino-17-demetoxi geldanamicina (17-DMAG). Ambos são resultantes de alterações do grupamento metoxilo não essencial presente no carbono 17 por diferentes aminas. Do mesmo modo que a GA, 17-AAG e 17-DMAG se ligam ao NTD da Hsp90, no local de ligação ao ATP (SCHULTE e NECKERS, 1998; JEZ et al., 2003).

#### Quadro 1 - Inibidores da Hsp90

Inibidores do NTD
<ul style="list-style-type: none"> <li> <b>Compostos naturais e seus derivados</b> <ul style="list-style-type: none"> <li>GA (17-AAG, 17-DMAG, IPI-504, IPI-493, macbecina)</li> <li>Radicol (KF 55823, KF 25706, radester, poconina D)</li> </ul> </li> <li> <b>Compostos sintéticos</b> <ul style="list-style-type: none"> <li><b>Purine scaffold</b> (PU3, CNF-2024/BIIB021, EC144, MPC-3100, MPC-0767, CUDC-305, PU-H71)</li> <li><b>Inibidores com núcleo pirazol, isoxazol e benzamida</b> (CCT 018159, VER49009, NVP-AUY922/VER52296, NVP-HSP990, STA-9090, STA-1474, KW-2478, AT 13387, SNX-5422, SNX-2122)</li> </ul> </li> </ul>
Inibidores do CTD
Novobiocina (A4, DHN1, DHN2)
Inibidores da interação HSP90/co-chaperona
Celastrol, gedunina

Fonte: Sidera & Patsavoudi, 2014

## 1.8 INIBIDORES DA FAMÍLIA DA GA EM INFECÇÕES PARASITÁRIAS

Estudos demonstram que a inibição da Hsp90 pela GA e seus análogos, 17-AAG e 17-DMAG, leva à inibição do crescimento e da sobrevivência de diferentes parasitos protozoários (WIESGIGL e CLOS, 2001; PALLAVI et al., 2010; PETERSEN et al., 2012; SANTOS et al., 2014). Graefe e colaboradores (2002) demonstraram que o tratamento de epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* com GA reduziu a proliferação deste parasito de maneira dose-dependente (GRAEFE et al, 2002). Em um modelo murino de tripanossomíase, o tratamento com 17-AAG inibiu o crescimento de *T. evansi* quando comparado aos animais tratados com o veículo (PALLAVI et al., 2010). O tratamento com GA inibiu o crescimento de *Plasmodium falciparum* intracelular em eritrócitos e, a partir de ensaios de *pulldown*, foi demonstrado que a GA se liga especificamente a Hsp90 desse parasito. Neste mesmo trabalho, foi demonstrado que a GA se liga com maior afinidade à Hsp90 de *P. falciparum* do que a Hsp90 humana (PALLAVI et al., 2010). Estes autores ainda demonstraram que o 17-AAG inibiu o crescimento de *P. falciparum* isolado de pacientes. Recentemente, Murillo-Solano et al. (2017) demonstraram que GA, 17-AAG e 17-DMAG suprimiram o crescimento de *P. falciparum* em concentrações que não foram tóxicas para as células do hospedeiro.

O tratamento de promastigotas de *L. donovani* com GA resultou em inibição do crescimento do parasito de maneira dose-dependente (WIESGIGL e CLOS, 2001). Li et al. (2009) demonstraram que a GA induziu apoptose em promastigotas axênicas de *L. donovani*. O tratamento de promastigotas axênicas de *L. braziliensis* com 17-AAG induziu a morte dos parasitos e esse efeito foi observado de maneira dose-dependente. O mesmo efeito foi observado em macrófagos infectados por *L. braziliensis*, que apresentaram redução da carga parasitária (SANTOS et al., 2014). Promastigotas de *L. panamensis* e *L. infantum* quando tratadas com 17-AAG apresentaram redução da proliferação quando comparadas ao grupo controle (VARELA-M et al, 2014). Nosso grupo demonstrou que o 17-AAG foi capaz de reduzir em 90% o percentual de macrófagos infectados por *L. amazonensis*, assim como o número de parasitos intracelulares. Esse efeito ocorreu em doses que não foram tóxicas para a célula hospedeira da *Leishmania* spp, o macrófago. O 17-AAG foi capaz de eliminar as formas promastigotas, que colonizam o inseto vetor, bem

como amastigotas, que são encontradas no interior dos macrófagos. O efeito leishmanicida sobre os parasitos intracelulares foi irreversível e mostrou ser independente da produção de óxido nítrico, de superóxido, bem como de moléculas pró-inflamatórias pelos macrófagos (PETERSEN et al., 2012). Recentemente, foi demonstrado que camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis* e tratados por via intraperitoneal com 17-DMAG, análogo solúvel do 17-AAG, exibiram redução do tamanho da lesão na orelha infectada, assim como redução da carga parasitária na orelha e no linfonodo drenante da lesão (dados não publicados). Em conjunto, esses dados demonstram que a Hsp90 de *Leishmania* é um alvo promissor para intervenção de drogas e que os mecanismos envolvidos na inibição da Hsp90 devem ser melhor explorados.

## 2 JUSTIFICATIVA E HIPÓTESE

A leishmaniose é uma doença negligenciada que acomete, principalmente, indivíduos de baixa renda de países subdesenvolvidos. Esta doença está amplamente distribuída no mundo, sendo endêmica em 98 países. Independente da manifestação clínica da doença, o tratamento convencional é baseado principalmente em antimoniais pentavalentes e anfotericina B. Entretanto, tais drogas exibem alta toxicidade, efeitos colaterais graves e administração prolongada. Além disso, recentemente, têm sido relatados casos de resistência a estas drogas. Desse modo, a busca por compostos mais eficazes e menos tóxicos para o tratamento da leishmaniose é emergencial.

Neste contexto, os inibidores da Hsp90 têm sido estudados para o tratamento da leishmaniose, entre eles, os inibidores da família da GA. Dados da literatura demonstram que estes inibidores apresentam atividade leishmanicida e podem ser melhor explorados quanto ao seu potencial para tratamento futuro da leishmaniose. Estudos demonstraram que o 17-AAG foi capaz de reduzir em 90% o percentual de macrófagos infectados por *L. amazonensis*, assim como o número de parasitos intracelulares. Esse efeito ocorreu em doses que não foram tóxicas para o macrófago, que é a célula hospedeira para *Leishmania* spp (PETERSEN et al., 2012). Em nosso laboratório, demonstramos que o tratamento com o inibidor 17-DMAG, análogo hidrossolúvel do 17-AAG, reduziu o tamanho da lesão na orelha de

camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis*, assim como reduziu a carga parasitária na orelha e no linfonodo drenante da lesão (dados não publicados).

Apesar das evidências do efeito leishmanicida desses inibidores, pouco se sabe como atuam durante a infecção por *Leishmania*. Assim, para desenvolvimento de um esquema terapêutico ideal para a leishmaniose, por meio do uso de inibidores da Hsp90, a compreensão dos mecanismos envolvidos na ação leishmanicida desses compostos é fundamental. Nossa hipótese é que inibidores da Hsp90 teriam um efeito duplo, direto sobre a *Leishmania* como sobre a célula hospedeira, modulando a resposta inata, facilitando a morte intracelular de *L. amazonensis*. Dessa forma, a eficácia em matar o parasito em concentrações não tóxicas para o macrófago, poderia estar relacionada a uma maior afinidade dos inibidores da família da GA pela Hsp90 do parasito em comparação a sua afinidade pela Hsp90 da célula hospedeira, resultante de possíveis diferenças estruturais e funcionais entre ortólogos da Hsp90 de *Leishmania* e da célula hospedeira. Adicionalmente, hipotetizamos que inibidores da família da GA poderiam contribuir para a morte do parasito por meio de ativação do inflamassomo.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 OBJETIVO GERAL

Investigar possíveis mecanismos de ação dos inibidores da Hsp90 da família da GA sobre a morte de *Leishmania*

#### 3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Comparar a sensibilidade do parasito e da célula hospedeira a inibidores de Hsp90;
- Caracterizar, *in silico*, o complexo Hsp90 do hospedeiro ou da *Leishmania* com inibidores de Hsp90;
- Identificar possíveis diferenças na capacidade de interação de inibidores de Hsp90 com a Hsp90 do hospedeiro e Hsp83 da *Leishmania*;
- Avaliar a influência de NLRP3 no percentual de infecção e na viabilidade intracelular de *L. amazonensis* durante o tratamento com 17-DMAG;

- Avaliar a produção de IL-1 $\beta$  em células infectadas por *L. amazonensis* tratadas com o inibidor de Hsp90, 17-DMAG;
- Avaliar a influência de caspase 1 na viabilidade intracelular de *L. amazonensis* durante o tratamento com 17-DMAG.

## 4 METODOLOGIA

### 4.1 PARASITOS

Promastigotas axênicas da espécie *L. amazonensis* (MHOM/Br88/Ba-125) foram cultivadas em meio Schneider (Gibco, Grand Island, NY, USA) suplementado com 50  $\mu$ g/ml de gentamicina (Gibco, Grand Island, NY, USA) e 10% de soro bovino fetal (Gibco, Grand Island, NY, USA), a 24 °C em estufa B.O.D. Ao atingir a fase estacionária de crescimento, as promastigotas de *Leishmania* foram utilizadas para a infecção nos experimentos na proporção de 10:1 (parasito/célula).

### 4.2 ANIMAIS

Camundongos C57BL/6 fêmeas, de 6 a 8 semanas, foram fornecidos pelo biotério do Instituto Gonçalo Moniz (IGM). Todos os procedimentos foram realizados de acordo com as normas do Comitê de Ética em Uso de Animais (CEUA) do IGM (CEUA 005/2019). Em experimentos realizados com macrófagos NLRP3<sup>-/-</sup>, os camundongos NLRP3<sup>-/-</sup> foram provenientes do biotério da Universidade de São Paulo (Ribeirão Preto), em colaboração com Dr. Dario Zamboni.

### 4.3 INIBIDORES DA HSP90

Os inibidores GA (Invivogen, San Diego, CA, EUA), 17-AAG (LC Laboratories, Woburn, MA, EUA) e 17-DMAG (LC Laboratories, Woburn, MA, EUA) foram reconstituídos em soluções estoques de 5 mM, sendo GA e 17-AAG diluídos em dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) e o 17-DMAG diluído em água apirogênica.

#### 4.4 CULTIVO DE CÉLULAS THP-1 E CÉLULAS MRC-5

Células monocíticas humanas THP-1 e células MRC-5 foram cultivadas em meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 (Gibco, Grand Island, NY, EUA) suplementado com 2 g / L de bicarbonato de sódio (Sigma, St Louis, MO, EUA), 25 mM de ácido N-2-hidroxietil piperazina-N'-2-etano-sulfônico (HEPES) (Sigma, St Louis, MO, EUA), 1 mM de piruvato de sódio (Sigma, Reino Unido), 2 mM de glutamina (Gibco, Grand Island, NY, EUA), 10 µg/mL de ciprofloxacina (Isofarma, Precabura, CE, BR) e 10% de soro fetal bovino (Gibco, Grand Island, NY, EUA). As culturas foram mantidas em estufa com 5% de CO<sub>2</sub> a 37 °C até o momento da realização dos experimentos.

#### 4.5 OBTENÇÃO E CULTURA DE MACRÓFAGOS DERIVADOS DE MEDULA ÓSSEA (BMMΦ)

Células precursoras, presentes na medula óssea, foram obtidas a partir da lavagem da cavidade óssea do fêmur e da tíbia de camundongos C57BL/6 e cultivadas a 37 °C em meio RPMI suplementado com 25 mM de HEPES (Sigma, St. Louis, MO, USA), 2 g/L de bicarbonato de sódio (Sigma, St. Louis, MO, USA), 10% de soro bovino fetal (Gibco, Grand Island, NY, USA), 10 µg/mL de ciprofloxacina (Isofarma, Eusébio, CE, Brasil), 200 mM glutamina (Sigma, St. Louis, MO, USA) e 30% de sobrenadante de células L929. No 4º dia de cultivo, a cultura celular foi suplementada com meio RPMI completo contendo 30% de sobrenadante de células L929. Após três dias, os BMMΦ aderidos foram recuperados por lavagem da placa de cultura com solução de PBS 1x contendo 1 mM de EDTA, centrifugados 300 xg por 10 min à 4 °C e, posteriormente, ressuspensos em meio RPMI completo, seguido de contagem em câmara de Neubauer para determinação do número de células e, depois, plaqueamento para utilização nos experimentos.

#### 4.6 ENSAIO ANTI-*Leishmania*

Promastigotas axênicas de *L. amazonensis* em fase logarítmica de crescimento foram distribuídas em placas de 96 poços (4 x 10<sup>5</sup> parasitos / poço em 200 µL) em meio Schneider completo e tratadas com GA (Invivogen, San Diego, CA, EUA), 17-AAG (LC Laboratories, Woburn, MA, EUA) ou 17-DMAG (LC Laboratories, Woburn, MA, EUA) em diluições seriadas de 12 etapas (1: 2) a partir de uma concentração inicial de 2 µM. Após 72 h de tratamento a 24 °C, os parasitos foram

incubados com Alamar Blue® a 10% (Invitrogen, Carlsbad, CA, EUA) por 1h30 min. Em seguida, a densidade óptica foi lida nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm em espectrofotômetro (SPECTRA Max 340 PC) para determinar a viabilidade celular, expressa em termos percentuais, e usada para calcular os valores de IC<sub>50</sub>. Estes valores foram determinados aplicando regressão sigmoidal às curvas de concentração-resposta usando o GraphPad Prism versão 5.0, em pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicatas.

#### 4.7 ENSAIO DE CITOTOXICIDADE

Células THP-1 foram centrifugadas a 300xg por 10 min a 4 °C e ressuspensas (10<sup>5</sup> células / 100 µL) em meio RPMI completo contendo 100 nM de forbol 12-miristato 13-acetato (PMA) e depois distribuídas em placas de 96 poços. As culturas foram incubadas a 37 °C por 72 h para induzir a diferenciação em macrófagos. Após esse período, os poços foram lavados duas vezes com salina, o meio RPMI completo (sem PMA) foi repostado e as células foram reincubadas a 37 °C por mais 48 h. As culturas foram então tratadas com GA, 17-AAG ou 17-DMAG em diluições seriadas de 12 etapas (1: 2) com uma concentração inicial de 50 µM. Após 72 h de tratamento a 37 °C, as células foram incubadas com Alamar Blue® a 10% por 22 h. Após este período, as placas foram lidas nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm em espectrofotômetro (SPECTRA Max 340 PC). Os dados obtidos foram utilizados para calcular a porcentagem de viabilidade celular e, posteriormente, o valor de CC<sub>50</sub> foi determinado a partir da regressão sigmoidal das curvas de concentração-resposta usando o GraphPad Prism (versão 5.0) de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicata. Também foram realizados ensaios de citotoxicidade com fibroblastos pulmonares humanos (células MRC-5). Para este fim, as células MRC-5 foram centrifugadas a 300xg por 10 min a 4 °C e plaqueadas (2,5 x 10<sup>4</sup> por poço) em meio RPMI completo e incubadas a 37 °C por 24 h. As células foram então tratadas com 17-AAG ou 17-DMAG (concentrações iniciais: 400 µM e 50 µM, respectivamente) seguindo o mesmo protocolo para células THP-1. Após 72 h, foi adicionado Alamar blue® e as placas foram lidas em um espectrofotômetro. Os valores de CC<sub>50</sub> foram determinados da mesma maneira que para células THP-1.

#### 4.8 ENSAIO DE VIABILIDADE INTRACELULAR

Para demonstrar a atividade dos inibidores de Hsp90 contra amastigotas de *L. amazonensis*, foram realizados ensaios de viabilidade intracelular usando 17-DMAG. Células THP-1 ( $5 \times 10^5$  por poço em 500  $\mu$ L) foram plaqueadas em meio RPMI completo com PMA (100 nM) a 37 °C para promover a diferenciação em macrófagos. Após 72 h, as células foram lavadas com salina e o meio (sem PMA) foi repostado. Após 48 h em meio sem PMA, as células foram infectadas por promastigotas de *L. amazonensis* em fase estacionária de crescimento (10:1) por 6 h. Em seguida, as células foram lavadas duas vezes com salina para remoção dos parasitos não internalizados, o meio foi repostado e as células foram tratadas com 17-DMAG nas concentrações de 6,25 nM, 12,5 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 300 nM e 400 nM, seguido por um período de incubação de 72 h. As células foram lavadas com salina, o meio Schneider completo foi adicionado e as culturas foram mantidas a 24 °C em estufa B. O. D. Após quatro dias, os parasitos foram contados em câmara de Neubauer. A partir da contagem dos parasitos foi determinada a viabilidade intracelular, expressa em termos percentuais, que foi usada para calcular o valor de IC<sub>50</sub>. O valor foi determinado aplicando regressão sigmoideal às curvas de concentração-resposta usando o GraphPad Prism versão 5.0.

#### 4.9 ABORDAGEM *IN SILICO*

A estrutura inicial da GA foi obtida a partir de um complexo co-cristalizado do domínio N-terminal da Hsp90 humana com a GA (código PDB 1YET, disponível no RCSB Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org>). As estruturas do 17-AAG e do 17-DMAG foram construídas a partir de modificações apropriadas na estrutura da GA obtida, usando o programa SPARTAN '08. O programa Balloon foi utilizado para gerar diferentes conformações para cada um dos três inibidores macrocíclicos da Hsp90: GA, 17-AAG e 17-DMAG. As configurações do programa usadas para criar essas novas conformações do anel macrocíclico estão disponíveis na Tabela 1. A otimização dessas conformações foi realizada usando o método da mecânica molecular MMFF (Merck Molecular Force Field), disponível no programa SPARTAN'08, usando as configurações padrão internas para os critérios de convergência.



**Tabela 1** – Configurações usadas para criar as 5 novas conformações para os inibidores HSP90, usando o programa Balloon

Parâmetros	Valor
-c	-
--listAtomTypes	-
-k	-
-fullforce	-
--randomSeed	1000
-v	2
-i	500
--maxtime	10000000
--nGenerations	1000
--nicheRadius	1.5
-R	1.0
--	500
maxPostprocessIter	
--	500
maxShapelIterations	
--tournamentSize	20

A estrutura do domínio N-terminal da Hsp83 de *L. amazonensis* foi modelizada usando a ferramenta de modelagem por homologia SWISS-MODEL, inserindo a sequência de aminoácidos da Hsp83 de *L. amazonensis* disponível no NCBI (código GenBank AAA29250.1, disponível no *National Center Biotechnology Information*, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). O modelo 3h80.1.A foi selecionado para uso neste estudo, com 93,20% de identidade de sequência com a estrutura primária da proteína. Este modelo foi construído com base na estrutura da Hsp83 de *L. major*.

Análises de *docking* foram realizadas com cada um dos inibidores da Hsp90 e o domínio N-terminal da Hsp90 humana (código PDB 1YET), assim como com o domínio N-terminal da Hsp83 de *L. amazonensis* modelizada. Todos os átomos dentro de um raio de 15,0 Å ao redor da GA co-cristalizada foram considerados para definir o local de ligação usado para a análise dos outros dois inibidores. O software GOLD 5.2 foi usado para realização dos cálculos de *docking* usando o *score* ChemPLP, que é uma função empírica de pontuação baseada em energia que avalia o *docking* da proteína-ligante, classificando as ligações que são geradas entre a proteína e o ligante. Utilizando uma biblioteca conformacional, os seguintes resíduos da Hsp83 de *L. amazonensis* foram tratados como flexíveis: Asn30, Ser33, Asn34, Asp37, Lys41, Asp76, Met81, Asn89, Leu90 e Phe121; para a Hsp90 humana, os resíduos tratados como flexíveis foram Leu48, Asn51, Ser52, Asp93,

Met98, Asp102, Asn106, Lys112, Thr152 e Thr184. As moléculas de água (HOH) dentro do local de ligação foram consideradas em nossos cálculos de *docking*, permitindo a translação, rotação e movimentação dessas moléculas de água a uma distância de 2 Å da posição inicial co-cristalizada. O programa BINANA foi empregado para analisar as interações moleculares resultantes do *docking*, usando as configurações padrão. Por fim, o sistema de visualização molecular PyMOL foi utilizado para gerar as imagens da estrutura da proteína.

#### 4.10 AVALIAÇÃO DO EFEITO DO 17-DMAG NA ATIVAÇÃO DO INFLAMOSSOMA DURANTE INFECÇÃO POR *Leishmania*

##### 4.10.1 Avaliação do percentual de infecção em BMMΦ NLRP3<sup>-/-</sup> tratados com 17-DMAG

BMMΦ de camundongos selvagens (WT) ou camundongos NLRP3<sup>-/-</sup> (gentilmente doados pelo Dr. Dario Zamboni – USP Ribeirão Preto) foram plaqueados (2 x 10<sup>5</sup> células por poço em 500 µL) em meio RPMI completo e, após 24 h, foram infectados por promastigotas axênicas de *L. amazonensis* em fase estacionária de crescimento (10 parasitos por célula) a 35 °C. Após 6 h de infecção, os poços foram lavados duas vezes com salina para remoção dos parasitos não internalizados, o meio foi repostado e as células foram tratadas com 100 nM de 17-DMAG (LC Laboratories, Woburn, MA, USA) por 12, 24, 48 ou 72 h. Após cada período, as células foram lavadas em salina, fixadas em paraformaldeído 4% (PFA) e marcadas com DAPI (Invitrogen). O percentual de infecção foi quantificado por microscopia de fluorescência (Menezes *et al.*, 2019).

##### 4.10.2 Avaliação da viabilidade intracelular de *L. amazonensis* em BMMΦ NLRP3<sup>-/-</sup> tratados com 17-DMAG

BMMΦ de camundongos selvagens (WT) ou camundongos NLRP3<sup>-/-</sup> foram plaqueados (2 x 10<sup>5</sup> células por poço em 500 µL) em meio RPMI completo e, após 24 h, foram infectados por promastigotas axênicas de *L. amazonensis* em fase estacionária de crescimento (10 parasitos por célula) a 35 °C. Após 6 h de infecção, os poços foram lavados duas vezes com salina para remoção dos parasitos não

internalizados, o meio foi repostado e as células foram tratadas com 100 nM de 17-DMAG (LC Laboratories, Woburn, MA, USA) por 6, 12 ou 24 h. Após cada período, as células foram lavadas duas vezes com salina, seguido de adição de meio Schneider completo e incubação das células a 24 °C em estufa B. O. D. Após 5 dias, os parasitas viáveis foram contados em câmara de Neubauer.

#### 4.10.3 *Avaliação da produção de IL-1 $\beta$ em BMM $\Phi$ infectados e tratados com 17-DMAG*

BMM $\Phi$  de camundongos C57BL/6 foram plaqueados ( $5 \times 10^5$  células por poço em 500  $\mu$ L) em meio RPMI completo e, após 24 h, foram estimulados com 500 ng mL<sup>-1</sup> de LPS por 3 h. Após este período, as células foram lavadas duas vezes com salina, o meio foi repostado e as células foram incubadas com 20  $\mu$ M do inibidor de caspase-1 Z-WEHD-FMK (R&D Systems, Mineapolis, MN, USA) durante uma hora. Em seguida, as células foram infectadas com promastigotas axênicas de *L. amazonensis* em fase estacionária de crescimento (10 parasitos por célula) a 35 °C. Após 6 h de infecção, os poços foram lavados duas vezes com salina para remoção dos parasitos não internalizados. Posteriormente, o meio foi repostado e as células foram tratadas com 100 nM de 17-DMAG por 48 h. Após este período, o sobrenadante dos poços foi coletado e os níveis de IL-1 $\beta$  foram quantificados utilizando o kit de ELISA para IL-1 $\beta$  (R&D Systems, Mineapolis, MN, USA), de acordo com as instruções do fabricante.

#### 4.10.4 *Avaliação do efeito da inibição de caspase 1 na viabilidade intracelular de L. amazonensis em BMM $\Phi$ tratados com 17-DMAG*

BMM $\Phi$  de camundongos C57BL/6 foram plaqueados ( $2 \times 10^5$  células por poço em 500  $\mu$ L) em meio RPMI completo e, após 24 h, foram incubados com 20  $\mu$ M do inibidor de caspase-1 Z-WEHD-FMK (R&D Systems, Mineapolis, MN, USA) durante uma hora. Após este período, as células foram infectadas por promastigotas axênicas de *L. amazonensis* em fase estacionária (10 parasitos por célula) a 35 °C. Após 6 h de infecção, os poços foram lavados duas vezes com salina para remoção dos parasitos não internalizados. Em seguida, o meio foi repostado e as células foram tratadas com 100 nM de 17-DMAG por 6 ou 24 h. Após cada período, as células

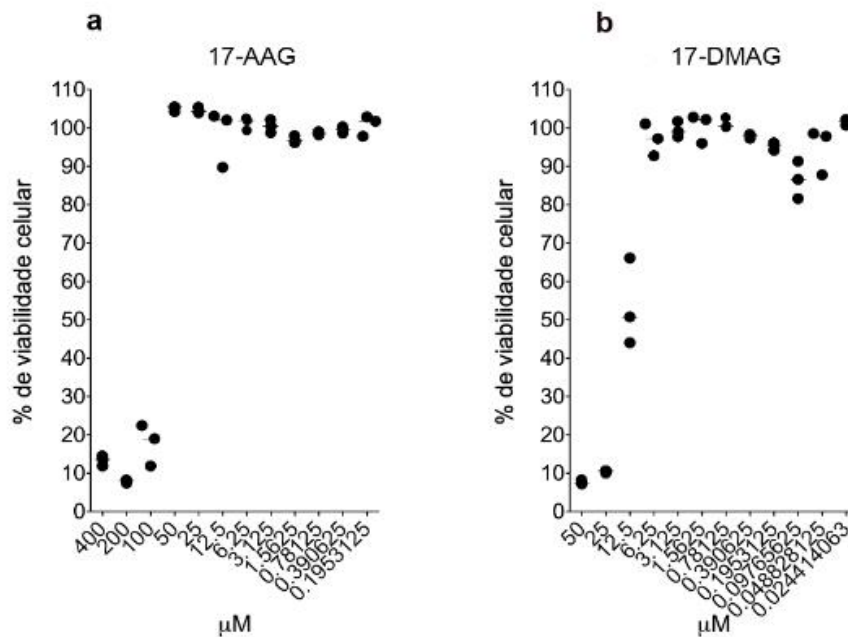
foram lavadas duas vezes com salina, seguido de adição de meio Schneider completo e incubação das células a 24 °C em estufa B. O. D., onde ocorre a liberação de amastigotas intracelulares no meio, que quando viáveis, se transformam em promastigotas. Após 5 dias, os parasitas viáveis foram contados em câmara de Neubauer.

## **5 RESULTADOS**

### **5.1 CITOTOXICIDADE DE INIBIDORES DA HSP90 CONTRA CÉLULAS DE MAMÍFERO E PARASITOS**

#### **5.1.1 Células MRC-5**

Para avaliar a citotoxicidade dos inibidores de Hsp90 sobre células de mamífero, realizamos ensaios de viabilidade celular em fibroblastos pulmonares humanos (células MRC-5) tratados com 17-AAG ou 17-DMAG. Foi observado que os inibidores testados apresentaram altos valores de  $CC_{50}$  de 13,24  $\mu$ M para o 17-DMAG e 86,15  $\mu$ M para o 17-AAG no tempo de 72 h de tratamento (Fig.7).

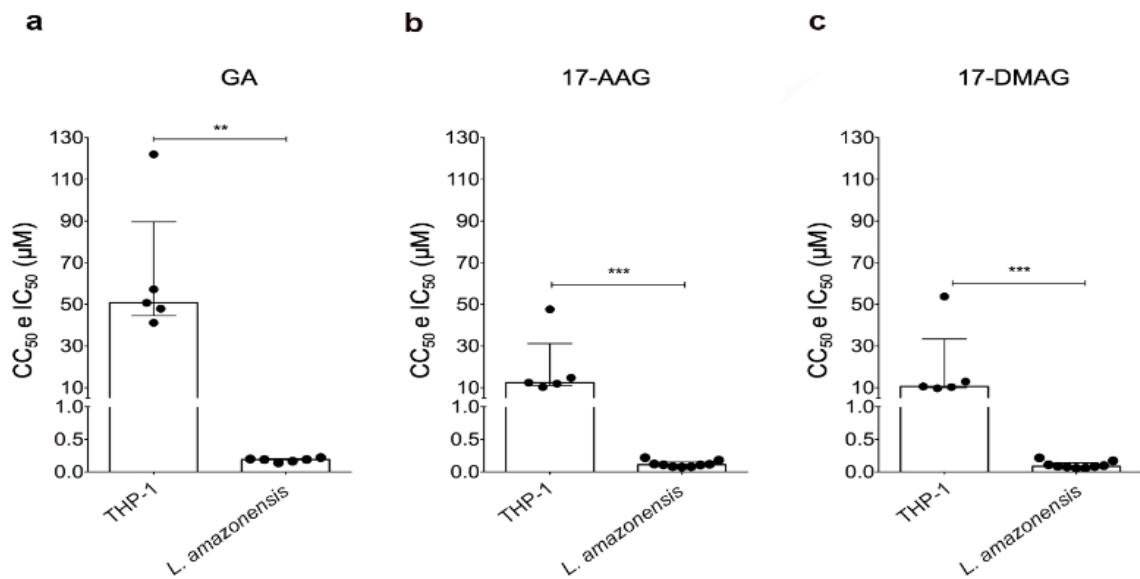


**Figura 7. Citotoxicidade dos inibidores de Hsp90, 17-AAG e 17-DMAG sobre células MRC-5.** Células MRC-5 foram plaqueadas ( $2,5 \times 10^4$  por poço) em meio RPMI completo e incubadas a  $37^\circ\text{C}$  por 24 h. As células foram então tratadas com 17-AAG ou 17-DMAG em diluições seriadas de 12 passos (1:2) (concentrações iniciais:  $400 \mu\text{M}$  e  $50 \mu\text{M}$ , respectivamente). Após 72 h de tratamento, as placas foram incubadas com 10% de Alamar Blue®. Em seguida, a densidade óptica foi lida nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm em espectrofotômetro para determinar a viabilidade celular, expressa em termos percentuais, usada para calcular o valor de  $\text{CC}_{50}$ .

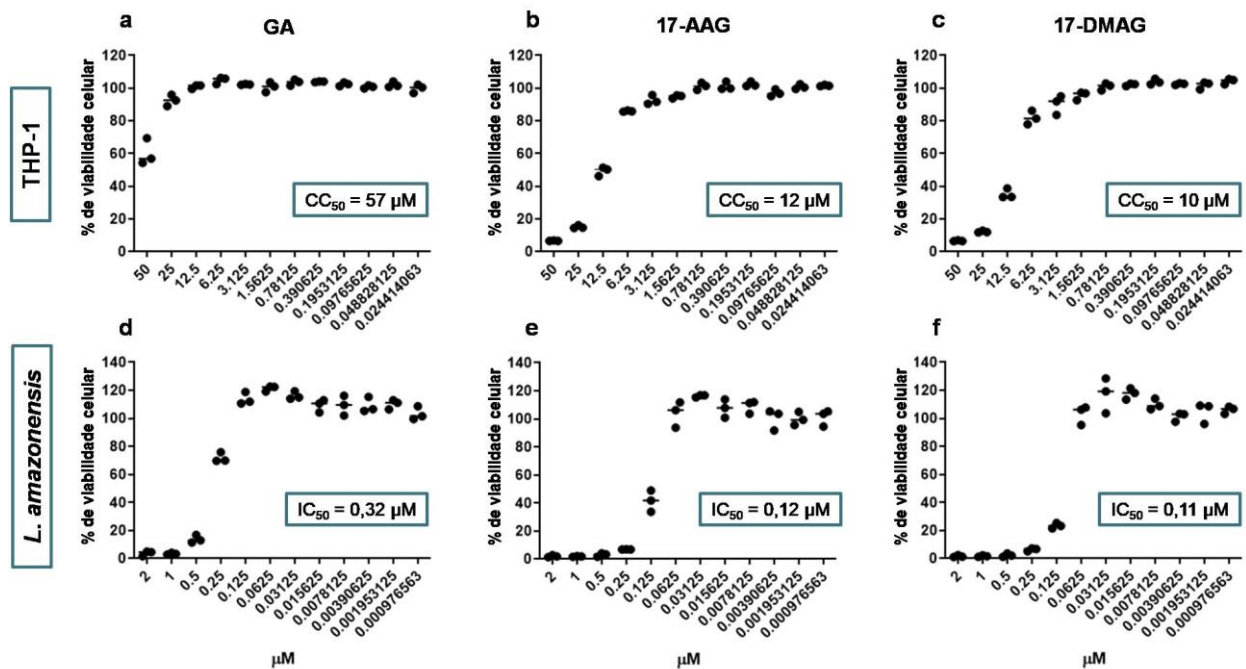
### 5.1.2 Células humanas THP-1 e *L. amazonensis*

Observamos que GA reduziu em 50% a viabilidade de células THP-1 na concentração de  $50,77 \mu\text{M}$  (Q1:  $44,57 \mu\text{M}$  e Q3:  $89,62 \mu\text{M}$ ), quando comparada à concentração observada em parasito, que foi de  $0,1910 \mu\text{M}$  (Q1:  $0,16 \mu\text{M}$  e Q3:  $0,20 \mu\text{M}$ ) ( $p = 0,0043$ ) (Fig.8a). Estes dados foram utilizados para calcular o índice de seletividade (IS) da GA, que foi 266, ou seja, 266 vezes mais GA foi necessário para matar 50% das células THP-1 em comparação com 50% das promastigotas de *L. amazonensis*. Quanto ao 17-AAG, este inibidor reduziu a viabilidade de células THP-1 em 50% em uma concentração de  $12,47 \mu\text{M}$  (Q1:  $11,17 \mu\text{M}$  e Q3:  $31,22 \mu\text{M}$ ), enquanto que contra o parasito, o valor de  $\text{IC}_{50}$  foi significativamente menor:  $0,1105 \mu\text{M}$  (Q1:  $0,08 \mu\text{M}$  e Q3:  $0,15 \mu\text{M}$ ) ( $p = 0,001$ ) (Fig. 8b), resultando em um IS de 113 para 17-AAG. O valor de  $\text{CC}_{50}$  para o 17-DMAG foi de  $10,60 \mu\text{M}$  (Q1:  $10,04 \mu\text{M}$  e Q3:  $33,39 \mu\text{M}$ ) para as células THP-1 em comparação com o valor de  $\text{IC}_{50}$  de  $0,0861 \mu\text{M}$  (Q1:  $0,07 \mu\text{M}$  e Q3:  $0,14 \mu\text{M}$ ) observado em promastigotas de *L. amazonensis* ( $p = 0,001$ ) (Fig.8c), resultando em um IS no valor de 123. A GA apresentou o IS mais

alto quando comparado ao 17-AAG ou 17-DMAG. Em conjunto, esses resultados indicam que todos os inibidores avaliados apresentaram maior toxicidade contra *L. amazonensis* do que contra a célula hospedeira. A figura 9 apresenta o percentual da viabilidade celular em células THP-1 e em *L. amazonensis*, que foi utilizado para cálculo do  $CC_{50}$  e  $IC_{50}$  referente a um experimento representativo de 5 experimentos realizados em triplicata (Fig. 9).



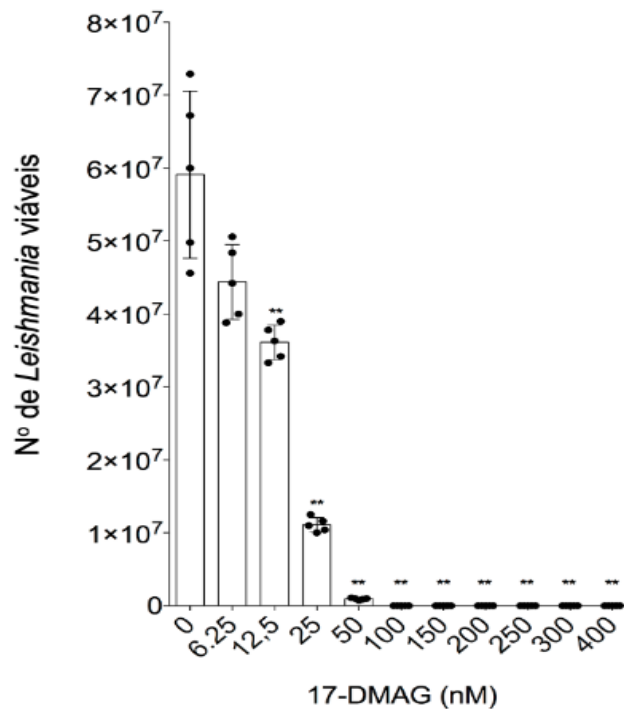
**Figura 8. Citotoxicidade de inibidores da Hsp90 a células humanas THP-1 e *L. amazonensis*.** Células THP-1 diferenciadas em macrófagos ou promastigotas axênicas de *L. amazonensis* foram distribuídas em placas de 96 poços e tratadas com GA, 17-AAG ou 17-DMAG em diluições seriadas de 12 passos (1:2) em uma concentração inicial de 50 µM (THP-1) ou 2 µM (*Leishmania*). Após 72 h de tratamento, as placas foram incubadas com 10% de Alamar Blue®. Em seguida, a densidade óptica foi lida nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm em espectrofotômetro para determinar a viabilidade celular, expressa em termos percentuais, usada para calcular o valor de  $CC_{50}$  (THP-1) ou  $IC_{50}$  (*Leishmania*). Este valor corresponde a mediana de pelo menos três experimentos independentes realizados em triplicatas (Teste Mann Whitney, \*\*\* $p = 0,001$ , \*\* $p = 0,0043$ ).



**Figura 9.** Percentual de viabilidade celular das células humanas THP-1 e de *L. amazonensis* tratadas com inibidores da Hsp90. Células THP-1 diferenciadas em macrófagos (a-c) ou promastigotas axênicas de *L. amazonensis* (d-f) foram distribuídas em placas de 96 poços e tratadas com GA, 17-AAG ou 17-DMAG em diluições seriadas em 12 passos (1:2) em uma concentração inicial de 50 μM (THP-1) ou 2 μM (*Leishmania*). Após 72 h de tratamento, as placas foram incubadas com 10% de Alamar Blue®. Em seguida, a densidade óptica foi lida nos comprimentos de onda de 570 e 600 nm em espectrofotômetro para determinar a viabilidade celular, expressa em termos percentuais, usada para calcular o valor de CC<sub>50</sub> (THP-1) ou IC<sub>50</sub> (*Leishmania*). Experimento representativo de pelo menos 5 experimentos independentes realizados em triplicatas.

## 5.2 EFEITO CITOTÓXICO DO INIBIDOR DA HSP90, 17-DMAG, CONTRA AS FORMAS AMASTIGOTAS DE *L. amazonensis*

O efeito citotóxico foi também avaliado contra formas amastigotas por meio de ensaio de viabilidade intracelular em macrófagos infectados e tratados com 17-DMAG. O 17-DMAG também levou à redução da viabilidade intracelular de forma dose-dependente e, em concentrações de 100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM, 300 nM e 400 nM de 17-DMAG, nenhum parasita viável foi observado nas culturas (Fig. 10), tendo apresentado o valor de IC<sub>50</sub> de 13,4 nM.



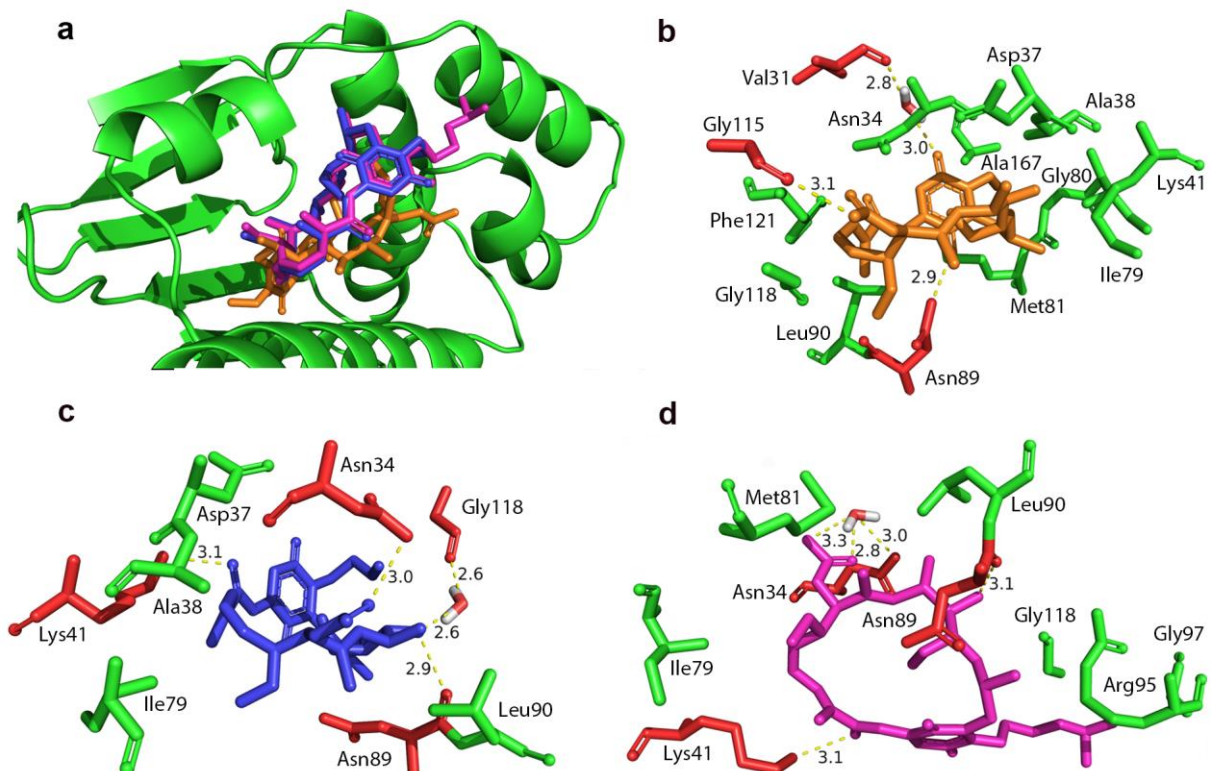
**Figura 10. Viabilidade intracelular de *L. amazonensis* em células THP-1 infectadas e, posteriormente, tratadas com 17-DMAG.** Células THP-1 foram plaqueadas em meio RPMI com PMA (100 nM) para promover a diferenciação em macrófagos e depois foram infectadas por promastigotas de *L. amazonensis* (10:1) por 6 h. Após lavagem para remoção dos parasitos não internalizados e reposição do meio RPMI, as células foram tratadas com 17-DMAG em concentrações de 6,25 nM, 12,5 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM, 300 nM e 400 nM por 72 h. Após esse período, os poços foram lavados com salina, meio completo Schneider foi adicionado e as células foram incubadas a 24 °C em estufa B.O.D. Após quatro dias, os parasitos viáveis foram contados em câmara de Neubauer (n = 1, experimento em quintuplicata, Teste Mann Whitney, \*\*p < 0,01).

### 5.3 INTERAÇÕES DOS INIBIDORES DE HSP90, GA, 17-AAG E 17-DMAG, COM HSP83 DE *L. amazonensis* OU HSP90 HUMANA

Para entender a razão pelas quais os inibidores de Hsp90, GA, 17-AAG e 17-DMAG, apresentam maior atividade leishmanicida, posteriormente, partimos para avaliar se existem diferenças na forma de interação desses inibidores com o domínio N-terminal da Hsp90 do parasito e do hospedeiro. Como esperado, foi observado que o sítio de ligação dos inibidores, GA, 17-AAG e 17-DMAG, à Hsp83 de *L. amazonensis* é semelhante (Fig. 11a). A análise da interação da GA com o domínio N-terminal da Hsp83 de *L. amazonensis* revelou que a GA (Fig. 11b), possivelmente, formou uma ligação de hidrogênio, intermediada por uma molécula de água, a uma distância (doador-aceptor) de 3,0Å ao resíduo Val31, ligações de hidrogênio a uma distância de 2,9Å (Asn89); 3.1Å (Gly115) e fez contatos hidrofóbicos com os resíduos Asn34, Asp37, Ala38, Lys41, Ile79, Gly80, Met81, Leu90, Gly118, Phe121

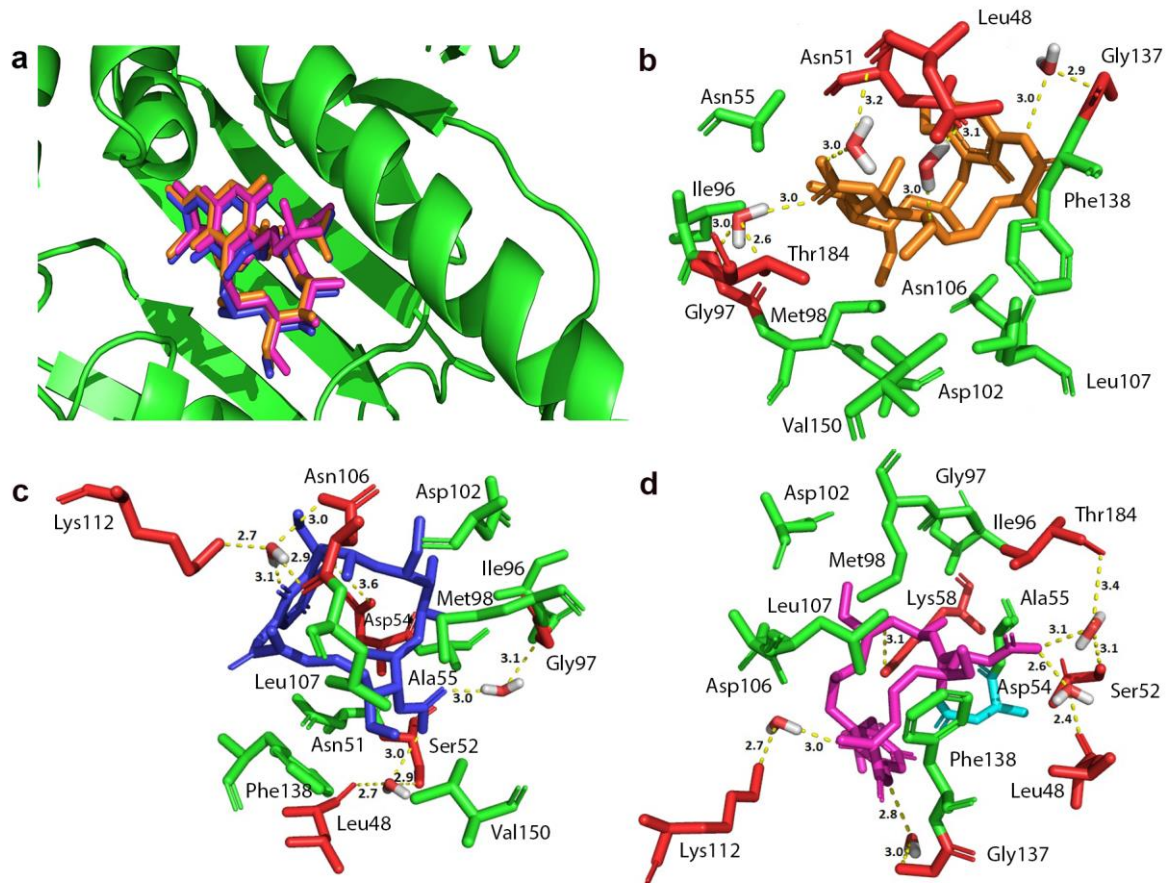


e Ala167. A análise da interação entre o 17-AAG e o domínio N-terminal da Hsp83 de *L. amazonensis* sugere que este inibidor (Fig. 11c) formou uma ligação de hidrogênio, intermediada por uma molécula de água, a uma distância de 2,6Å ao resíduo Gly118, além de ligações de hidrogênio a uma distância de 3,0Å (Asn34); 3,1Å (Lys41); 2,9Å (Asn89) e apresentou contatos hidrofóbicos com a maioria dos resíduos que fizeram contato com GA, Asp37, Ala38, Ile79 e Leu90. Por outro lado, essa análise de interação revelou que o 17-DMAG (Fig. 11d), provavelmente, formou duas ligações de hidrogênio, intermediadas por uma única molécula de água, a distâncias de 3,3Å e 2,8Å ao resíduo Asn34, além de fazer ligações de hidrogênio com os resíduos Lys41 e Asn89 a uma distância de 3,1Å. Adicionalmente, a análise de *docking* demonstrou que o 17-DMAG fez contatos hidrofóbicos com os resíduos Ile79, Met81, Leu90, Arg95, Gly97 e Gly118.



**Figura 11. Sítio de ligação e tipos de interação da Hsp83 de *L. amazonensis* com os inibidores de Hsp90.** A estrutura do domínio N-terminal da Hsp83 de *L. amazonensis* foi modelizada usando a ferramenta de modelagem por homologia SWISS-MODEL, inserindo a seqüência de aminoácidos da Hsp83 de *L. amazonensis* disponível no NCBI (GenBank código AAA29250.1, disponível no National Center Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). A análise de *docking* foi realizada para estudar a ligação de cada um dos inibidores da Hsp90 ao domínio N-terminal da Hsp83 de *L. amazonensis*. (a) Sítio de ligação da Hsp83 aos inibidores GA (laranja), 17-AAG (azul) e 17-DMAG (magenta); (b) Interação entre resíduos do domínio N-terminal da Hsp83 com GA (laranja); (c) Interação entre resíduos do domínio N-terminal da Hsp83 com 17-AAG (azul); (d) Interação entre resíduos do domínio N-terminal da Hsp83 com 17-DMAG (magenta). Os resíduos da Hsp83 que fazem contatos hidrofóbicos estão em verde e os resíduos que fazem ligações de hidrogênio estão em vermelho.

Quanto à interação com o domínio N-terminal da Hsp90 humana, como esperado, foi observado que para todos os inibidores testados, GA, 17-AAG e 17-DMAG, o local de ligação à Hsp90 humana foi idêntico (Fig 12a). A análise *in silico* sugeriu que o composto natural GA (Fig. 12b) formou ligações de hidrogênio, intermediadas por moléculas de água, a uma distância de 3,0Å com os seguintes resíduos de aminoácidos: Leu48, Asn51, Gly97, Thr184 e Gly137, assim como fez contatos hidrofóbicos com os resíduos Asn55, Ile96, Met98, Asp102, Asn106, Leu107, Phe138 e Val150. Além disso, o análogo da GA, 17-AAG (Fig. 12c), possivelmente formou ligações de hidrogênio, interligadas por moléculas de água, com resíduos de aminoácidos nas seguintes distâncias: 3,0Å (Leu48 e Ser52), 3,6Å (Asp54), 3,0 Å (Gly97) e 3.1Å (Asn106 e Lys112). O 17-AAG fez contatos hidrofóbicos com a maioria dos resíduos que fizeram esses contatos com a GA: Ala55, Ile96, Met98, Asp102, Leu107, Phe138 e Val150, exceto Asn51. Por outro lado, 17-DMAG (Fig. 12d), provavelmente, formou ligações de hidrogênio, intermediadas por moléculas de água, a outros resíduos de aminoácidos diferentes da GA. As distâncias entre o composto e os resíduos de aminoácidos foram (doador-aceptor): 2,6Å (Leu48), 3,1Å (Ser52 e Thr184), 3,0Å (Lys112) e 2,8Å (Gly137). A análise demonstrou também que o 17-DMAG formou uma ligação de hidrogênio com o resíduo Lys58 a uma distância de 3,1Å, assim como uma ligação salina com o resíduo Asp54 e fez contatos hidrofóbicos com os resíduos: Ala55, Ile96, Gly97, Met98, Asp102, Asn106, Leu107 e Phe138.



**Figura 12. Sítio de ligação e tipos de interação da Hsp90 humana com os inibidores de Hsp90.** A estrutura da Hsp90 humana foi obtida a partir de um complexo co-cristalizado do domínio N-terminal da Hsp90 humana com a GA (código PDB 1YET, disponível no RCSB Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org>). A análise de *docking* foi realizada para estudar a interação de cada um dos inibidores da Hsp90 ao domínio N-terminal da Hsp90 humana. (a) Sítio de ligação da Hsp90 aos inibidores GA (laranja), 17-AAG (azul) e 17-DMAG (magenta); (b) Interação entre resíduos do domínio N-terminal da Hsp90 a GA (laranja); (c) Interação entre resíduos do domínio N-terminal da Hsp90 ao 17-AAG (azul); (d) Interação entre resíduos do domínio N-terminal da Hsp90 com 17-DMAG (magenta). Os resíduos da Hsp90 que fazem contatos hidrofóbicos estão em verde e os resíduos que fazem ligações de hidrogênio estão em vermelho.

Para aplicar uma análise quantitativa das interações entre os inibidores e os domínios N-terminais da Hsp83 de *L. amazonensis* ou da Hsp90 humana, foram determinados os scores ChemPLP das interações observadas. Para isso, o programa Balloon gerou seis conformações de cada composto. As pontuações da análise ChemPLP para todas as seis conformações de cada inibidor da Hsp90 estão listadas na Tabela 2. A análise demonstrou que todos os inibidores estudados apresentaram pontuações mais altas quando acoplados ao domínio N-terminal da Hsp83 de *L. amazonensis* do que quando acoplados ao domínio N-terminal da Hsp90 humana: GA (73,89 vs. 54,30), 17-AAG (75,81 vs. 56,02) e 17-DMAG (78,02 vs. 54,53), respectivamente.

**Tabela 2** - Scores ChemPLP para cada inibidor e suas respectivas conformações quando ligadas ao domínio N-terminal da Hsp83 de *L. amazonensis* ou Hsp90 humana.

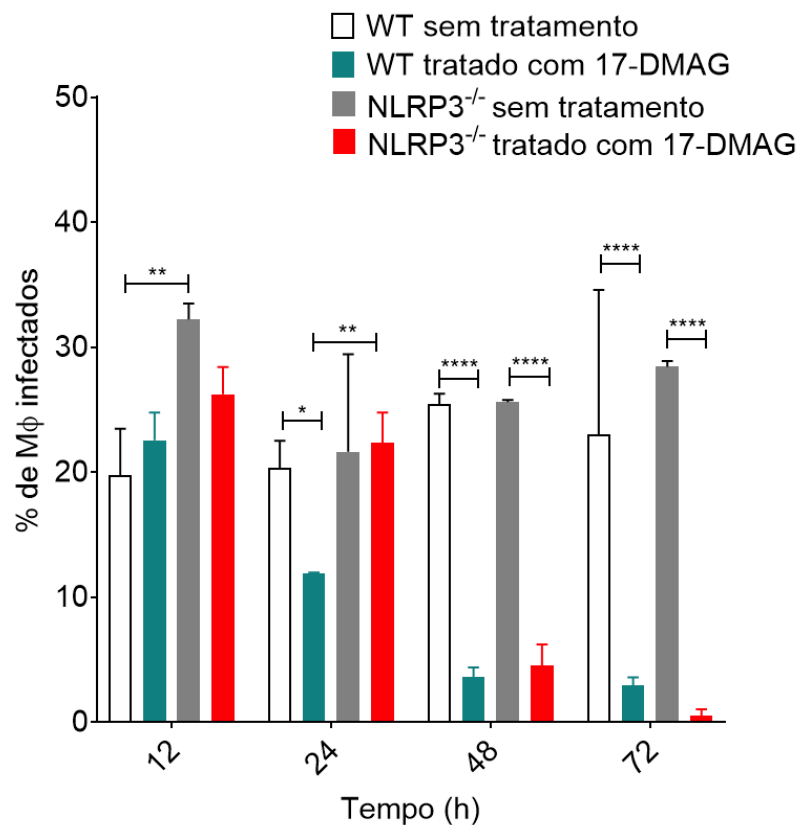
Inibidor		Conformação 1	Conformação 2	Conformação 3	Conformação 4	Conformação 5	Conformação 6	Média
<b>GA</b>	Hsp83 La	73,48	74,37	83,16	72,13	70,51	69,67	<b>73,89</b>
	Hsp90 humana	73,38	52,45	48,68	51,51	46,62	53,14	<b>54,30</b>
<b>17-AAG</b>	Hsp83 La	65,83	81,82	73,75	79,50	72,50	81,47	<b>75,81</b>
	Hsp90 humana	70,05	47,94	46,34	63,80	51,19	56,80	<b>56,02</b>
<b>17-DMAG</b>	Hsp83 La	81,79	80,58	85,35	69,12	73,13	78,17	<b>78,02</b>
	Hsp90 humana	68,85	51,11	50,94	54,94	52,38	48,97	<b>54,53</b>

## 5.4 EFEITO DO 17-DMAG NA ATIVAÇÃO DO INFLAMASSOMA EM RESPOSTA À INFECÇÃO POR *Leishmania*

### 5.4.1 Influência do inflamassoma NLRP3 sobre o tratamento por 17-DMAG de macrófagos infectados por *L. amazonensis*

Inicialmente, avaliamos a influência do inflamassoma NLRP3 sobre o percentual de infecção de macrófagos NLRP3<sup>-/-</sup> infectados por *L. amazonensis* e tratados com 17-DMAG. Macrófagos infectados e tratados com 17-DMAG de camundongos WT foram utilizados como controle. No tempo de 12 h, foi observado maior percentual de infecção em BMMΦ de camundongos NLRP3<sup>-/-</sup> não tratados (32,2 ± 3,5%) quando comparados com BMMΦ de camundongos WT não tratados (19,76 ± 2,68%) (\*\**p*=0,0091). Interessantemente, no tempo de 24 h, o percentual de infecção foi maior em BMMΦ de camundongos NLRP3<sup>-/-</sup> tratados com 17-DMAG (22,37 ± 3,28%) do que em BMMΦ de camundongos WT tratados (11,87 ± 1,53%) (\*\**p*=0,0059), sugerindo que a ausência do NLRP3 favoreceu a infecção nas células tratadas com 17-DMAG. Como esperado, o tratamento com 17-DMAG em BMMΦ de camundongos WT reduziu o percentual de infecção (11,87 ± 1,53%) quando comparado com células WT não tratadas no tempo de 24 h (20,33 ± 2,98%) (\**p*=0,0421). Nos tempos tardios de 48 e 72 h, não foi observada diferença no percentual de infecção entre macrófagos NLRP3<sup>-/-</sup> e macrófagos WT quando tratados com 17-DMAG. Ainda nesses tempos, o percentual de infecção foi menor em macrófagos WT tratados com 17-DMAG quando comparado ao percentual em

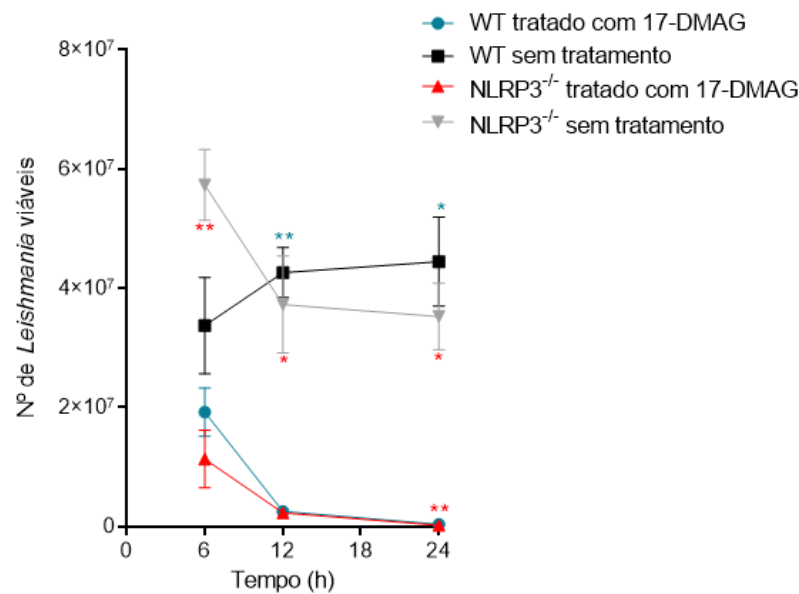
macrófagos WT não tratados ( $****p < 0,0001$ ). O mesmo foi observado entre células NLRP3<sup>-/-</sup> tratadas com 17-DMAG e células NLRP3<sup>-/-</sup> não tratadas ( $****p < 0,0001$ ) (Fig. 13).



**Figura 13. Efeito do 17-DMAG sobre o percentual de infecção de macrófagos NLRP3<sup>-/-</sup> infectados por *L. amazonensis*.** BMMΦ de camundongos NLRP3<sup>-/-</sup> foram plaqueados ( $2 \times 10^5$  células por poço) em meio RPMI completo e, após 24 h, foram infectados por promastigotas axênicas de *L. amazonensis* em fase estacionária (10 parasitos por célula) a 35 °C. Em paralelo, macrófagos de camundongos WT infectados foram usados como controle. Após 6 h de infecção, os poços de todos os grupos foram lavados duas vezes com salina para remoção dos parasitos não internalizados, o meio foi repostado e as células foram tratadas com 100 nM de 17-DMAG por 12, 24, 48 ou 72 h. Após cada período, as células foram fixadas em paraformaldeído (PFA) e marcadas com DAPI. O percentual de infecção foi quantificado por microscopia de fluorescência (n=1, experimento em quintuplicata, One-way ANOVA, teste Sidak's).

#### 5.4.2 Efeito do 17-DMAG sobre a viabilidade intracelular de *L. amazonensis* em macrófagos NLRP3<sup>-/-</sup> infectados

Posteriormente, buscamos avaliar o efeito do 17-DMAG na viabilidade intracelular dos parasitos em macrófagos de camundongos NLRP3<sup>-/-</sup> infectados por *L. amazonensis*. Macrófagos infectados e tratados com 17-DMAG de camundongos WT foram utilizados como controle. Nos tempos de tratamento avaliados, não foi observada diferença na viabilidade intracelular de *L. amazonensis* entre BMMΦ de camundongos NLRP3<sup>-/-</sup> tratados e BMMΦ de camundongos WT tratados, exceto no tempo de 24 h, em que a viabilidade foi maior em BMMΦ de camundongos WT tratados ( $3,97 \times 10^5 \pm 5,76 \times 10^4$  vs  $2,23 \times 10^5 \pm 5,66 \times 10^4$ ) (\*\* $p=0,0058$ ). No tempo de 6 h, foi observada redução na viabilidade intracelular do parasito em BMMΦ de camundongos NLRP3<sup>-/-</sup> tratados com 17-DMAG quando comparados com a viabilidade das amastigotas em BMMΦ de camundongos NLRP3<sup>-/-</sup> não tratados ( $1,13 \times 10^7 \pm 1,09 \times 10^7$  vs  $5,73 \times 10^7 \pm 1,32 \times 10^7$ ) (\*\* $p= 0,0017$ ). No tempo de 12 h, o tratamento com 17-DMAG reduziu drasticamente a viabilidade intracelular dos parasitos em BMMΦ de camundongos WT ( $2,54 \times 10^6 \pm 8,4 \times 10^5$  vs  $4,26 \times 10^7 \pm 9,47 \times 10^6$ , \*\* $p=0,0023$ ) e NLRP3<sup>-/-</sup> ( $2,29 \times 10^6 \pm 8,5 \times 10^5$  vs  $3,72 \times 10^7 \pm 1,82 \times 10^7$ , \* $p=0,0418$ ), quando comparada à viabilidade de *L. amazonensis* em células não tratadas. O mesmo foi observado no tempo de 24 h, em que o tratamento com 17-DMAG reduziu a viabilidade intracelular dos parasitos em BMMΦ de camundongos WT ( $3,97 \times 10^5 \pm 5,76 \times 10^4$  vs  $4,44 \times 10^7 \pm 1,68 \times 10^7$ , \* $p=0,0144$ ) e NLRP3<sup>-/-</sup> ( $2,23 \times 10^5 \pm 5,66 \times 10^4$  vs  $3,52 \times 10^7 \pm 1,24 \times 10^7$ , \* $p=0,0110$ ), quando comparada à viabilidade de *L. amazonensis* em células não tratadas (Fig.14). Os dados sugerem que a ausência do NLRP3 não interferiu na viabilidade intracelular do parasito em macrófagos infectados tratados com 17-DMAG.

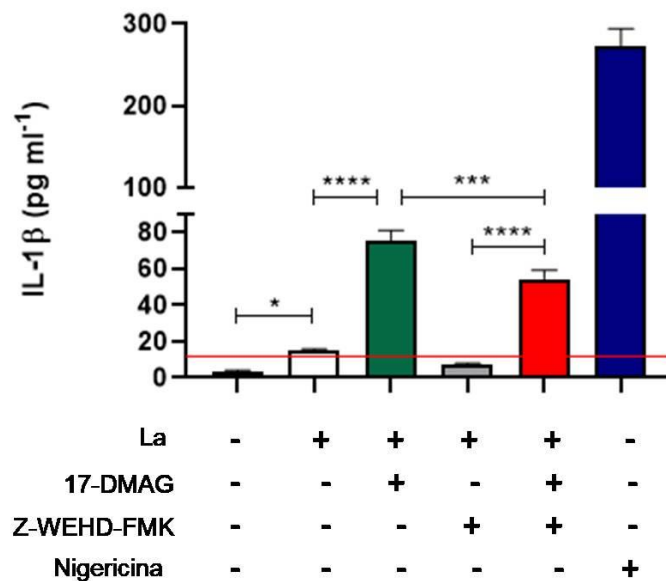


**Figura 14. Efeito do 17-DMAG sobre a viabilidade intracelular de *L. amazonensis* em macrófagos NLRP3<sup>-/-</sup> infectados.** BMMΦ de camundongos NLRP3<sup>-/-</sup> foram plaqueados ( $2 \times 10^5$  células por poço) em meio RPMI completo e, após 24 h, foram infectados por promastigotas axênicas de *L. amazonensis* em fase estacionária (10 parasitos por célula) a 35 °C. Em paralelo, macrófagos infectados de camundongos WT foram utilizados como controle. Após 6 h de infecção, os poços de todos os grupos foram lavados duas vezes com salina para remoção dos parasitos não internalizados, o meio foi repostado e as células foram tratadas com 100 nM de 17-DMAG por 6, 12 ou 24 h. Após cada período, os poços foram lavados duas vezes com salina, meio Schneider completo foi adicionado e as células foram incubadas em estufa B.O.D. a 24 °C durante 5 dias. Em seguida, os parasitos viáveis foram contados em câmara de Neubauer (n=1, experimento em quintuplicata, Two-way ANOVA).

#### 5.4.3 Efeito da inibição da caspase 1 sobre a produção de IL-1β em macrófagos infectados por *L. amazonensis* e tratados com 17-DMAG

Avaliamos a produção de IL-1β em macrófagos infectados por *L. amazonensis* e tratados com 17-DMAG e investigamos se essa produção estaria relacionada à atividade da caspase 1. Assim, quantificamos a produção dessa citocina em células tratadas com inibidor de caspase 1, Z-WEHD-FMK em comparação a células controle somente estimuladas com LPS. As células não estimuladas com LPS apresentaram níveis de IL-1β abaixo da curva de detecção (dados não mostrados). Observamos maior produção de IL-1β em células infectadas tratadas com 17-DMAG ( $75,0 \pm 6,08$  pg/mL) quando comparadas com células infectadas sem tratamento apenas estimuladas por LPS ( $15,37 \pm 0,55$  pg/mL) (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ). Mesmo em células tratadas com inibidor de caspase 1, o 17-DMAG levou ao aumento da produção de IL-1β ( $54,33 \pm 4,73$  pg/mL) quando comparada à produção desta citocina por macrófagos não tratados com 17-DMAG ( $7,0 \pm 1,0$

pg/mL) (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ). Como esperado, a inibição de caspase 1 em células infectadas e tratadas com 17-DMAG levou a menor produção de IL-1 $\beta$  ( $54,33 \pm 4,73$  pg/mL) quando comparada à produção em células infectadas e tratadas com 17-DMAG não tratadas com o inibidor de caspase 1 ( $75,0 \pm 6,08$  pg/mL) (\*\*\* $p = 0,0002$ ) (Fig. 15). Este dado indica que a produção de IL-1 $\beta$  pelas células infectadas e tratadas com 17-DMAG foi parcialmente dependente de caspase 1. Células incubadas com nigericina foram utilizadas como controle positivo da produção de IL-1 $\beta$ , tendo mostrado valores elevados desta citocina ( $274,0 \pm 20,3$  pg/mL) (Fig. 15).



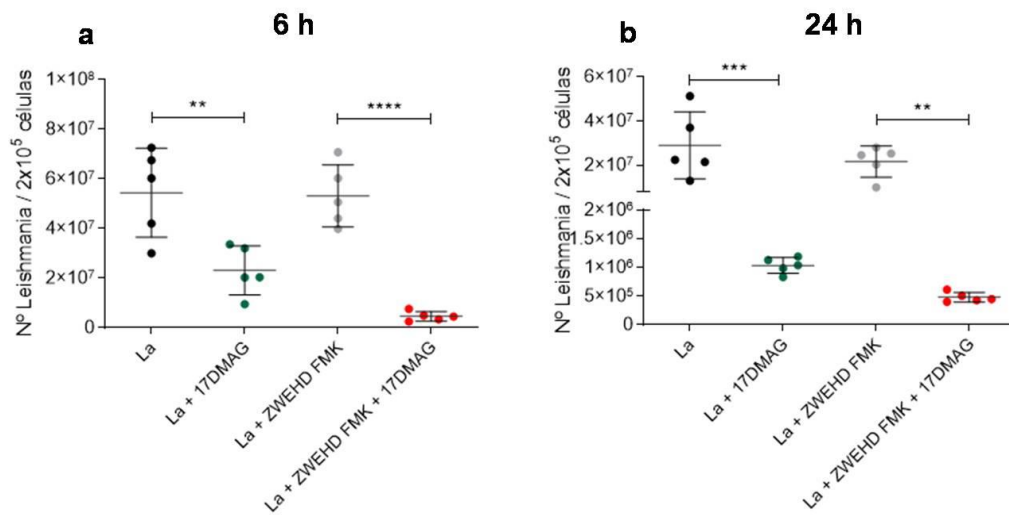
**Figura 15. Efeito da inibição da caspase 1 sobre a produção de IL-1 $\beta$  em macrófagos infectados por *L. amazonensis* tratados com 17-DMAG.** BMM $\Phi$  de camundongos C57BL/6 foram plaqueados ( $5 \times 10^5$  células por poço em 500  $\mu$ L) em meio RPMI completo e, após 24 h, foram estimulados com 500 ng mL<sup>-1</sup> de LPS por 3 h. Em seguida, os poços foram lavados duas vezes com salina, o meio foi repostado e as células foram incubadas com 20  $\mu$ M do inibidor de caspase-1, Z-WEHD-FMK, durante uma hora. Após este período, as células foram infectadas com promastigotas axênicas de *L. amazonensis* em fase estacionária de crescimento (10 parasitos por célula) a 35 °C. Após 6 h de infecção, os poços foram lavados duas vezes com salina para remoção dos parasitos não internalizados. Posteriormente, o meio foi repostado e as células foram tratadas com 100 nM de 17-DMAG por 48 h. Após este período, o sobrenadante dos poços foi coletado e os níveis de IL-1 $\beta$  foram quantificados utilizando o kit de ELISA para IL-1 $\beta$  (R&D Systems), de acordo com as instruções do fabricante (n = 1, experimento em triplicata, One-way ANOVA).

#### 5.4.4 Efeito da inibição da caspase 1 sobre a viabilidade intracelular dos parasitos em macrófagos infectados por *L. amazonensis* e tratados com 17-DMAG

Macrófagos infectados por *L. amazonensis* e tratados com 17-DMAG foram adicionalmente tratados com o inibidor de caspase 1, Z-WEHD-FMK, nos quais há



redução parcial da produção de IL-1 $\beta$  (Fig. 15), para avaliar o efeito desta inibição sobre a viabilidade intracelular dos parasitos. No tempo de 6 h, em células tratadas com 17-DMAG foi observada redução na viabilidade intracelular de *L. amazonensis* ( $2,3 \times 10^7 \pm 9,9 \times 10^6$ ), quando comparada à viabilidade dos parasitos em células não tratadas com 17-DMAG ( $5,4 \times 10^7 \pm 1,8 \times 10^7$ ) (\*\* $p= 0,0041$ ). O mesmo foi observado no tempo de 24 h, em que células tratadas com 17-DMAG apresentaram redução na viabilidade intracelular de *L. amazonensis* ( $1,0 \times 10^6 \pm 1,4 \times 10^5$ ), quando comparada à viabilidade dos parasitos em células não tratadas com 17-DMAG ( $2,9 \times 10^7 \pm 1,5 \times 10^7$ ) (\*\* $p= 0,0004$ ). Similarmente, o tratamento com 17-DMAG reduziu a viabilidade intracelular dos parasitos em células com inibição da caspase 1 ( $4,6 \times 10^6 \pm 1,9 \times 10^6$ ) quando comparadas com macrófagos tratados com o inibidor de caspase 1 não tratadas por 17-DMAG ( $5,3 \times 10^7 \pm 1,2 \times 10^7$ ) (\*\*\*\* $p<0,0001$ ), no tempo de 6 h. Como esperado, o tratamento com 17-DMAG durante 24 h também reduziu a viabilidade intracelular dos parasitos em células com inibição da caspase 1 ( $4,8 \times 10^5 \pm 8,5 \times 10^4$ ) quando comparadas com macrófagos tratados com o inibidor de caspase 1 não tratadas por 17-DMAG ( $2,2 \times 10^7 \pm 7,1 \times 10^6$ ) (\*\* $p= 0,0053$ ). Contudo, nos tempos avaliados, não foi observada diferença na viabilidade intracelular dos parasitos em células tratadas com o inibidor de caspase 1 tratadas com 17-DMAG e células não tratadas com esse inibidor e tratadas com 17-DMAG (Fig.16), indicando que a redução parcial da produção de IL-1 $\beta$  pelo inibidor de caspase 1 não reverteu o efeito leishmanicida do 17-DMAG.



**Figura 16. Efeito da inibição da caspase 1 sobre a viabilidade intracelular dos parasitos em macrófagos infectados por *L. amazonensis* e tratados com 17-DMAG.** BMMΦ de camundongos C57BL/6 foram plaqueados ( $2 \times 10^5$  células por poço em 500  $\mu$ L) em meio RPMI completo e, após 24 h, as células foram incubadas com 20  $\mu$ M do inibidor de caspase-1, Z-WEHD-FMK, durante uma hora. Em seguida, as células foram infectadas por promastigotas axênicas de *L. amazonensis* em fase estacionária (10 parasitos por célula) a 35 °C. Após 6 h de infecção, os poços foram lavados duas vezes com salina, para remoção dos parasitos não internalizados e as células foram tratadas com 100 nM de 17-DMAG por 6 (a) ou 24 h (b). Após cada período, as células foram lavadas duas vezes com salina, seguido de adição de meio Schneider completo e incubação das células a 24 °C em estufa B. O. D., onde ocorre a liberação de amastigotas intracelulares no meio, que quando viáveis, se transformam em promastigotas. Após 5 dias, os parasitas viáveis foram contados em câmara de Neubauer. (n=1, experimento em quintuplicata, One-way ANOVA).

## 6 DISCUSSÃO

A leishmaniose é uma doença que afeta milhões de indivíduos em todo o mundo, especialmente em países menos desenvolvidos e de população mais pobre, sendo uma doença negligenciada. O tratamento da doença é realizado, principalmente, com uso dos antimoniais pentavalentes e da anfotericina B. Entretanto, estas drogas apresentam algumas desvantagens como: efeitos adversos graves, via de administração parenteral, tratamento prolongado e eficácia variável (SUNDAR e CHAKRAVARTY, 2013; MENEZES et al., 2015). Assim, torna-se necessária a busca por novos fármacos para que esquemas de tratamento para a leishmaniose, mais eficazes e com menos efeitos adversos, possam ser implementados.

Recentemente, os inibidores da Hsp90 têm se tornado alvo de estudos como moléculas com atividade leishmanicida, em especial, os inibidores da família da GA (PETERSEN *et al.*, 2012; SANTOS *et al.*, 2014). Apesar do conhecimento sobre seus potenciais como moléculas leishmanicidas, pouco se sabe quais os mecanismos que possam estar envolvidos durante a resposta à infecção por *Leishmania*. Desse modo, o objetivo deste trabalho foi identificar possíveis mecanismos envolvidos na ação leishmanicida de inibidores da Hsp90. Para isso, avaliamos o efeito direto dos inibidores sobre o parasito, assim como o efeito do inibidor 17-DMAG sobre a célula hospedeira infectada.

Inicialmente, avaliamos a diferença de sensibilidade entre promastigotas de *L. amazonensis* e células THP-1 diferenciadas a três inibidores de Hsp90: GA, 17-AAG e 17-DMAG, sendo o último nunca descrito na literatura como composto com atividade anti-*Leishmania*. Os resultados demonstraram que todos os inibidores testados foram mais tóxicos aos parasitos do que à célula hospedeira, evidenciado pela diferença entre os valores de IC<sub>50</sub> (*Leishmania*) e CC<sub>50</sub> (células THP-1) observada para cada inibidor (Fig. 8). Murilo Solano e colaboradores (2017) demonstraram que GA, 17-AAG e 17-DMAG foram capazes de inibir o crescimento de *P. falciparum* em concentrações abaixo de 1 µM, enquanto que, em fibroblastos pulmonares humanos a inibição de crescimento só foi observada a partir da concentração de 10 µM, reforçando que os derivados de GA e GA tem efeito anti-parasitário amplo. Similar ao efeito anti-*Plasmodium*, foi demonstrado que promastigotas de *L. amazonensis* e *L. braziliensis* foram mais susceptíveis ao

tratamento com 17-AAG quando comparada à toxicidade a macrófagos murinos (PETERSEN et al, 2012; SANTOS et al, 2014). Essa diferença de sensibilidade observada entre parasito e célula hospedeira aos inibidores de Hsp90 reforça a idéia que a Hsp90 é um alvo promissor para tratamento da leishmaniose.

Os valores dos índices de seletividade observados para cada um dos inibidores (GA: 267,4; 17-AAG: 113,4; 17-DMAG: 117,8) também confirmam a diferença de sensibilidade entre o parasito e a célula hospedeira ao tratamento com tais compostos. Entre os três inibidores avaliados, a GA mostrou o maior índice de seletividade, o que poderia sugerir que este inibidor seria a melhor escolha para uso em estudos posteriores. Entretanto, é conhecido que a GA apresenta hepatotoxicidade, além de ter baixa solubilidade em água e ser instável quimicamente, o que inviabilizaria seu uso no tratamento da leishmaniose (SUPKO et al., 1995; NECKERS et al., 1999). O 17-AAG e o 17-DMAG, sintetizados a partir da GA, exibem menor toxicidade e, no caso do 17-DMAG, maior solubilidade em água que a GA (SIDERA e PATSAVOUD, 2014). Tais características fizeram com que o 17-AAG e o 17-DMAG fossem introduzidos em estudos clínicos *in vivo* como compostos anticancerígenos (HOLLINGSHEAD et al, 2005). O que nos leva a sugerir, que esses inibidores seriam bons candidatos para serem utilizados em estudos *in vivo* para tratamento da leishmaniose. Além disso, em razão das propriedades físico-químicas do 17-DMAG, maior solubilidade em água e melhor biodisponibilidade do que o 17-AAG, seria mais vantajoso seu uso em estudos *in vivo* (MELLATYAR et al, 2018). Dessa forma, o 17-DMAG foi, dos inibidores da Hsp90 utilizados no presente estudo, o escolhido para avaliações adicionais como para testar sua eficácia contra as formas amastigotas intracelulares. Nossos dados mostraram que, em comparação com as formas promastigotas, as amastigotas se mostraram mais sensíveis ao 17-DMAG (Fig. 10), reforçando o efeito leishmanicida deste inibidor.

Em seguida, buscamos caracterizar o complexo formado entre a Hsp90 do hospedeiro ou do parasito e os inibidores. Utilizando uma abordagem *in silico*, nós avaliamos a interação da GA, 17-AAG e 17-DMAG com o NTD de Hsp83 de *L. amazonensis* ou Hsp90 humana. Os resultados demonstraram que, com relação ao NTD da Hsp83 de *L. amazonensis*, os três inibidores formaram ligações de hidrogênio diretas e algumas ligações de hidrogênio mediadas por molécula de água, além de contatos hidrofóbicos com vários resíduos em comum (Fig. 11). Em

contraste, na interação com o NTD da Hsp90 humana, os três inibidores formaram várias ligações de hidrogênio, a maioria sendo mediada por água. Além disso, foram observados contatos hidrofóbicos com vários resíduos em comum (Fig. 12). Pizarro e colaboradores (2013) demonstraram a presença de ligações de hidrogênio mediadas por água, entre ligantes e os resíduos de aminoácidos do NTD da Hsp83 de *T. brucei*, e que as moléculas de água parecem ser importantes, pois mimetizam a posição de um dos grupos fosfato do ATP (PIZARRO et al, 2013). Entretanto, as numerosas ligações de hidrogênio mediadas por molécula de água, observadas nas interações entre o NTD da Hsp90 humana e GA, 17-AAG ou 17-DMAG, não oferecem um efeito estabilizador semelhante quando comparado às ligações de hidrogênio que se formam diretamente (NILAPWAR et al, 2009). A GA formou apenas ligações de hidrogênio mediadas por água ao interagir com o NTD da Hsp90 humana, enquanto que, ao interagir com o NTD da Hsp83 de *L. amazonensis*, realizou uma ligação de hidrogênio mediada por água e duas ligações de hidrogênio diretas. Já os inibidores 17-AAG e 17-DMAG formaram uma única ligação de hidrogênio direta (cada) com o NTD da Hsp90 humana, enquanto realizaram duas ligações de hidrogênio diretas (cada) com o NTD da Hsp83 de *L. amazonensis*. Essas diferenças podem ser importantes para a força da interação entre os inibidores e Hsp90/Hsp83. Quanto às semelhanças observadas nos tipos de interações entre cada um dos três inibidores e os NTDs da Hsp83 de *L. amazonensis* ou Hsp90 humana, estas podem ser explicadas pela similaridade química observada entre o GA e seus derivados, 17-AAG e 17-DMAG (PETRIKAITE e MATULIS, 2014).

Com o objetivo de identificar possíveis diferenças na capacidade de interação dos inibidores com a Hsp90 do hospedeiro e de *Leishmania*, foi realizado o estudo de *docking* da interação entre GA, 17-AAG e 17-DMAG e os NTDs da Hsp83 de *L. amazonensis* ou Hsp90 humana. Os resultados demonstraram que GA, 17-AAG e 17-DMAG apresentam maior tendência para se ligar a Hsp83 do parasito do que a Hsp90 humana (Tabela 2). Em estudo anterior realizado por Pizarro e colaboradores (2013), os compostos GA, 17-AAG e 17-DMAG exibiram ligação mais forte ao NTD da Hsp83 de *T. brucei* do que a Hsp90 humana. Além disso, análises cristalográficas revelaram que outros compostos, que também se ligam ao NTD da Hsp83 de *T. brucei*, podem alterar a conformação deste domínio, sugerindo flexibilidade estrutural da chaperona que pode influenciar na seletividade (PIZARRO et al, 2013).

Reforçando nossos resultados, alguns derivados da reblastatina, uma substância relacionada a GA, exibiram maior ligação a Hsp83 de *L. braziliensis* do que a Hsp90 humana (MOHAMMADI-OSTAD-KALAYEH et al., 2018). Da mesma forma, Kanwar e colaboradores (2017) demonstraram que os análogos de SNX-2112, inibidores da Hsp90, exibem atividade leishmanicida mas não são citotóxicos para o hospedeiro. Esses autores sugerem que isso pode ocorrer devido ao aumento da seletividade por parte dos análogos testados para Hsp83 de *Leishmania* em comparação com Hsp90 humana. No presente estudo, acreditamos que essa maior tendência de ligação dos inibidores a Hsp83 de *Leishmania* esteja relacionada às interações intermoleculares estabelecidas entre os inibidores e seus alvos. A presença de mais ligações de hidrogênio diretas, entre os inibidores e o NTD da Hsp83 de *L. amazonensis*, pode oferecer um maior efeito estabilizador quando comparado à interação entre os inibidores e o NTD da Hsp90 humana, que apresenta menos ligações de hidrogênio diretas. Para avaliar se os resultados das análises de *docking* de GA,17-AAG e 17-DMAG com os NTDs da Hsp83 de *L. amazonensis* ou Hsp90 humana serão também observados *in vitro*, estudos adicionais devem ser realizados empregando Hsp83 de *L. amazonensis* e Hsp90 humana recombinantes, por meio de ensaios de fluorimetria diferencial de varredura ou ressonância plasmônica de superfície. Em suma, a diferença de sensibilidade aos inibidores observada entre o hospedeiro e o parasito, juntamente com uma maior tendência de ligação dos inibidores a Hsp83 de *Leishmania* do que a Hsp90 humana, sugerem que uma atuação direta dos inibidores no parasito pode ser uma via para a morte do parasito.

Além da atuação direta dos inibidores de Hsp90 sobre o parasito, hipotetizamos que eles teriam um efeito sobre a resposta imune da célula hospedeira, contribuindo para morte do parasito. Avaliamos especificamente seu efeito na ativação do inflamassoma, em macrófagos murinos infectados por *L. amazonensis*. Este mecanismo imune inato da célula hospedeira frente à infecção por *Leishmania* foi descrito participar do controle da replicação do parasito (LIMA-JÚNIOR et al, 2013; LIMA-JÚNIOR et al, 2017; DE CARVALHO et al, 2019).

Inicialmente, em macrófagos infectados e tratados com 17-DMAG, verificamos a produção de IL-1 $\beta$ , que é um dos principais produtos que resultam da ativação do inflamassoma. Para que possamos medir a produção de IL-1 $\beta$  nesses ensaios, é necessário o *priming* dos macrófagos com LPS (ZAMBONI e SACKS,

2019). Em sobrenadante de macrófagos primados e infectados por *L. amazonensis* tratados com 17-DMAG, detectamos maiores níveis de IL-1 $\beta$  do que naqueles sobrenadantes de células infectadas não tratadas com 17-DMAG. Além disso, a inibição de caspase 1 reduziu em 28% os níveis de IL-1 $\beta$  produzidos por células tratadas com 17-DMAG, o que indica que a produção de IL-1 $\beta$  por estas células foi parcialmente dependente de caspase 1 (Fig. 15). Lima-Junior e colaboradores (2013) demonstraram a produção de IL-1 $\beta$  em macrófagos de camundongos C57BL/6 infectados por *L. amazonensis*, a qual foi dependente de caspase 1, visto que a produção da citocina foi drasticamente reduzida em macrófagos de camundongos *knockout* para caspase 1 (*Casp1*<sup>-/-</sup>). Entretanto, não se tem descrito como o tratamento com inibidores da família da GA em células infectadas por *Leishmania* pode influenciar na produção de IL-1 $\beta$ . Anteriormente, Piippo e colaboradores (2018) demonstraram que o tratamento com GA em células epiteliais de retina humana reduziu a ativação de caspase 1 e os níveis de IL-1 $\beta$  (PIIPPO et al, 2018). As aparentes discrepâncias desses resultados com os nossos podem ser explicadas pelo emprego de tipo celular distinto que o usado em nosso trabalho e pelo fato das células do nosso estudo estarem infectadas por *L. amazonensis*. Ainda distinto do nosso estudo, Nizami e colaboradores (2020), recentemente, demonstraram que o tratamento com o inibidor de Hsp90 de família diferente que a dos derivados de GA, EC144 (membro da família de inibidores *purine scaffold*, que se ligam ao sítio do ATP presente no NTD da Hsp90), reduziu a produção de IL-1 $\beta$  em macrófagos estimulados com nigericina. Em contraste com a literatura, em nosso modelo, 17-DMAG induz macrófagos infectados a aumentar a produção de IL-1 $\beta$  por um mecanismo parcialmente dependente de caspase 1, pois Z-WEHD-FMK somente parcialmente inibe a produção desta citocina.

Durante a infecção por *Leishmania*, a presença de espécies reativas de oxigênio pode induzir a ativação do inflamassoma e consequente produção de IL-1 $\beta$  (ZAMBONI e LIMA-JUNIOR, 2015). Dados da literatura mostram que a GA, o 17-AAG e o 17-DMAG podem promover a formação de espécies reativas de oxigênio, devido ao motivo quinona presente na estrutura desses compostos, em que o motivo quinona é reduzido gerando semiquinona, que por sua vez reduz o oxigênio e forma superóxido (SAMUNI et al, 2010). Assim, especulamos que em macrófagos infectados e tratados com 17-DMAG, o estresse oxidativo, sabidamente, resultante

da infecção por *Leishmania* em macrófagos primados por LPS, juntamente com uma possível formação de espécies reativas de oxigênio resultante do tratamento com 17-DMAG, possa favorecer a produção de IL-1 $\beta$  em nossos ensaios.

Dados da literatura demonstraram que a ativação do inflamassoma durante a infecção por *Leishmania* pode controlar a replicação do parasito (LIMA-JÚNIOR et al, 2013; LIMA-JÚNIOR et al, 2017; DE CARVALHO et al, 2019). Como caspase 1 é uma proteína fundamental para a ativação do inflamassoma, avaliamos a sobrevivência do parasito na ausência desta proteína em células tratadas com 17-DMAG. A inibição da caspase 1, por Z-WEHD-FMK, sobre a viabilidade intracelular de parasitos em macrófagos infectados por *L. amazonensis*, mas não primados por LPS, que foram tratados com 17-DMAG, demonstrou que a inibição de caspase 1 não interferiu na viabilidade intracelular dos parasitos em células tratadas com 17-DMAG (Fig. 16). Pontualmente, esse dado sugere que a presença de caspase 1 não influenciou na morte de *L. amazonensis* induzida pelo 17-DMAG. Entretanto, devemos salientar que este padrão foi observado também em células não tratadas com 17-DMAG. Assim, torna-se fundamental a realização de ensaios complementares, para avaliar se a caspase 1 foi efetivamente ativada nesse ensaio, por meio de ensaios de *western blotting* para caspase 1 e/ou ensaios de avaliação de ativação de caspase 1, como Caspase 1- Glo<sup>®</sup> ou FAM-FLICA<sup>®</sup> em células não primadas com LPS.

O inflamassoma NLRP3 é o principal inflamassoma envolvido durante a infecção por *Leishmania*, sendo o mais estudado (ZAMBONI e SACKS, 2019). Na tentativa de ampliar a análise anterior, verificamos a possível influência do inflamassoma NLRP3 sobre a morte de *L. amazonensis* em macrófagos não primados por LPS, tratados com 17-DMAG. Inicialmente, avaliamos o percentual de infecção e observamos que, apenas no tempo de 24 h de tratamento, o percentual de infecção foi maior em macrófagos NLRP3<sup>-/-</sup> tratados do que em macrófagos WT tratados, sugerindo que na ausência do NLRP3, o 17-DMAG mostrou um efeito reduzido sobre o percentual de macrófagos infectados. Como, em 48 e 72 h de tratamento, não foram observadas diferenças no percentual de infecção entre macrófagos NLRP3<sup>-/-</sup> tratados e macrófagos WT tratados, sugerimos que, em tempos maiores de tratamento com 17-DMAG, a ausência do NLRP3 não interferiu no controle da infecção por ação do 17-DMAG (Fig. 13). A partir desses dados,



partimos para avaliar a influência do inflamassoma NLRP3 na sobrevivência dos parasitos, por meio da determinação da viabilidade intracelular de *L. amazonensis* em macrófagos tratados com 17-DMAG. Foi observado que nos tempos de 6 e 12 h de tratamento não foi observada diferença na viabilidade intracelular de *L. amazonensis* em macrófagos NLRP3<sup>-/-</sup> tratados e macrófagos WT tratados. Além disso, no tempo de 24 h de tratamento, a diferença observada no percentual de infecção não se refletiu na viabilidade intracelular que, interessantemente, foi maior em macrófagos WT tratados (Fig. 14). Na maioria dos tempos de tratamento de 17-DMAG avaliados, os dados mostraram que ausência do NLRP3 não interferiu na morte do parasito induzida pelo 17-DMAG.

Em 2013, Lima-Junior e colaboradores descreveram o inflamassoma NLRP3 como plataforma imune inata para o controle da infecção por *Leishmania*. Neste trabalho, os autores mostraram que o inflamassoma NLRP3 é importante para a restrição da replicação de *L. amazonensis*, pois observaram aumento da infecção em macrófagos de camundongos *knockout* para os três componentes no inflamassoma: NLRP3, ASC e caspase 1, quando comparados aos animais WT (LIMA-JÚNIOR et al, 2013). Entretanto, o modo como uma molécula com atividade leishmanicida pode interferir na resposta do inflamassoma NLRP3 foi recentemente descrito na literatura. Iacano e colaboradores (2019) demonstraram que o tratamento com miltefosina reduziu o agrupamento dos componentes do inflamassoma NLRP3 em BMM $\Phi$  de camundongos C57BL/6, além de reduzir em 75% os níveis de IL-1 $\beta$ , quando comparado com macrófagos não tratados. No entanto, neste estudo, não foram observadas diferenças nos níveis protéicos dos componentes do inflamassoma entre células tratadas com miltefosina e células não tratadas sugerindo que a produção de IL-1 $\beta$  não ocorreu pela via do inflamassoma NLRP3 (IACANO et al, 2019). Por outro lado, Piippo e colaboradores demonstraram que em células epiteliais humanas de retina que foram tratadas com GA, observou-se redução dos níveis da proteína NLRP3 e que essa redução foi resultante da degradação de NLRP3 pela via autofágica, impedindo a ativação do inflamassoma NLRP3 (PIIPPO et al, 2018). A proteína NLRP3, após ser traduzida, forma um complexo com a Hsp90 e com a proteína supressora do alelo G2 da proteína SKP1 (SGT1), mantendo-a inativa, até que haja ativação por meio de *priming* do macrófago. Entretanto, a não formação desse complexo por meio da inibição da

Hsp90 leva à degradação de NLRP3 (MAYOR et al, 2007). Em um trabalho recente, foi demonstrado que o tratamento *in vivo* com 17-DMAG, em camundongos com doença hepática alcoólica, reduziu a expressão de *Nlrp3* em macrófagos hepáticos (CHOUDHURY et al, 2020). No presente estudo, a morte de *Leishmania* induzida pelo 17-DMAG não foi influenciada pela presença do NLRP3. Possivelmente, mudanças na expressão de *Nlrp3* ou degradação de NLRP3, como descrito nos estudos acima, não sejam eventos relevantes durante o tratamento com 17-DMAG em BMM $\Phi$  infectados por *L. amazonensis*.

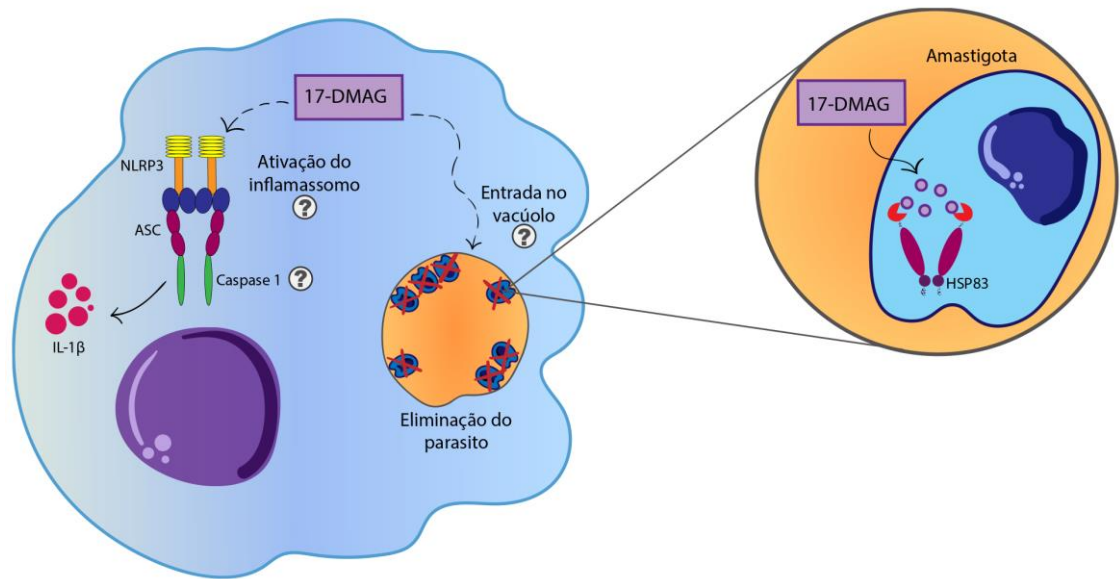
É importante destacar que no presente estudo avaliamos a influência do NLRP3 na morte de *Leishmania* induzida pelo 17-DMAG por meio da avaliação do percentual de infecção e a viabilidade intracelular do parasito em BMM $\Phi$  NLRP3<sup>-/-</sup> infectados e tratados com 17-DMAG. Entretanto, a avaliação da ativação do inflamassoma NLRP3 nas células infectadas tratadas com 17-DMAG deve ser conduzida, por meio da avaliação da produção de IL-1 $\beta$ , assim como por meio da marcação e quantificação dos *punctas* de NLRP3, um método para visualização direta da ativação deste inflamassoma, que pretendemos realizar futuramente.

Os achados aqui apresentados até o momento apontam para ideia que a morte de *Leishmania* induzida pelo 17-DMAG em macrófagos infectados não depende do inflamassoma NLRP3. É possível que outros inflamassomas possam estar sendo ativados em decorrência da inibição da Hsp90 induzida pelo 17-DMAG. Miranda e colaboradores (2015) demonstraram que o tratamento com ácido caurenóico, um composto com atividade leishmanicida, em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis*, aumentou os níveis de IL-1 $\beta$  e a expressão de NLRP12, evidenciando a participação deste inflamassoma no mecanismo de morte do parasito. A participação do inflamassoma AIM2 na infecção por *Leishmania* foi demonstrada por Moreira e colaboradores (2017), que observaram expressão gênica e protéica de AIM2 em lesão de pacientes com leishmaniose tegumentar causada por *L. braziliensis* (MOREIRA et al, 2017).

Os dados obtidos até o momento sobre a participação do inflamassoma durante a infecção por *L. amazonensis* em macrófagos tratados com 17-DMAG demonstraram que o tratamento com 17-DMAG induziu produção de IL-1 $\beta$  em macrófagos infectados, sugerindo ativação do inflamassoma. Além disso, a morte do parasito induzida por 17-DMAG parece não ser dependente de NLRP3. Entretanto,

devemos salientar que esses dados são exploratórios e precisam ser aprofundados. Analisando de forma mais ampla, é provável que a ocorra ativação do inflamassoma, mas esta ativação não seja determinante para a morte do parasito induzida pelo 17-DMAG. Em um estudo realizado por Petersen e colaboradores (2012) foi demonstrado que a morte de *L. amazonensis* induzida pelo 17-AAG foi independente da produção de superóxido e NO pela célula hospedeira e os autores sugeriram que a morte do parasito pode estar relacionada a uma ação direta do composto na *Leishmania* (PETERSEN et al, 2012). Assim, a realização de ensaios para avaliar a presença do composto 17-DMAG no vacúolo parasitóforo de *Leishmania* seria interessante para atribuímos o papel dessa rota na morte do parasito.

Neste trabalho, foi descrito pela primeira vez a atividade leishmanicida do inibidor 17-DMAG. Este inibidor, a GA e o 17-AAG foram mais tóxicos para o parasito do que para a célula hospedeira e apresentaram maior tendência de ligação a Hsp83 de *Leishmania* do que a Hsp90 humana. Além disso, o 17-DMAG induziu a produção de IL-1 $\beta$ , sugerindo ativação de inflamassoma em células infectadas por *L. amazonensis* (Fig. 17). No entanto, esta produção parece não estar influenciando na morte do parasito. A partir desses dados, que apontam para um possível efeito duplo do 17-DMAG, atuando diretamente no parasito e também sobre a célula hospedeira, juntamente com as características atribuídas a este inibidor (como maior biodisponibilidade e menor toxicidade *in vivo*, quando comparado a outros inibidores como a GA e o 17-AAG), o torna um candidato promissor para o tratamento da leishmaniose.



**Figura 17. Efeito do 17-DMAG durante a infecção por *Leishmania* e seus possíveis mecanismos de ação.** No presente estudo, demonstramos que o inibidor de Hsp90 17-DMAG apresenta atividade leishmanicida. Este efeito pode estar relacionado a uma atuação direta do 17-DMAG, que exibe uma maior interação com a Hsp90 do parasito em comparação à interação com a Hsp90 do hospedeiro. Especulamos que o 17-DMAG entre no vacúolo parasitóforo e, no interior deste, atue diretamente no parasito, por meio da ligação do inibidor com a Hsp83, interferindo assim na sua sobrevivência. Além do possível efeito direto do 17-DMAG sobre o parasito, demonstramos que o 17-DMAG também influenciou na resposta da célula hospedeira durante a infecção, induzindo o aumento da produção de IL-1 $\beta$ , sugerindo ativação do inflamassoma. A produção desta citocina foi parcialmente dependente de caspase-1, demonstrando que outras caspases inflamatórias também podem estar envolvidas neste processo.

## 7 CONCLUSÃO

O inibidor 17-DMAG tem efeito direto na morte de *L. amazonensis*, que pode ser explicada pela maior interação do inibidor pela Hsp90 do parasito em comparação a Hsp90 do hospedeiro;

O tratamento com 17-DMAG induz aumento da produção de IL-1 $\beta$  em macrófagos infectados, sem influenciar na morte de *L. amazonensis* intracelular.

## REFERÊNCIAS

- ALMEIDA, T. F. *et al.* Leishmania amazonensis fails to induce the release of reactive oxygen intermediates by CBA macrophages. **Parasite Immunology**, v. 34, n. 10, p. 492–498, out. 2012.
- ALVAR, J. *et al.* Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 31 maio 2012.
- AMATO, V. S. *et al.* Mucosal leishmaniasis: Description of case management approaches and analysis of risk factors for treatment failure in a cohort of 140 patients in Brazil. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 23, n. 9, p. 1026–1034, set. 2009.
- ANDERSEN, E. M. *et al.* Comparison of meglumine antimoniate and pentamidine for peruvian cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 72, n. 2, p. 133–7, fev. 2005.
- ARAÚJO-SANTOS, T. *et al.* Lutzomyia longipalpis saliva triggers lipid body formation and prostaglandin E2 production in murine macrophages. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 11, nov. 2010.
- BAILEY, M. S.; LOCKWOOD, D. N. J. Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v. 25, n. 2, p. 203–211, mar. 2007.
- BERMAN, J. D. *et al.* Susceptibility of clinically sensitive and resistant Leishmania to pentavalent antimony in vitro. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 31, n. 3 I, p. 459–465, 1982.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar [recurso eletrônico. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.
- BROWN, M. A. *et al.* Hsp90-From signal transduction to cell transformation. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 363, n. 2, p. 241–246, 16 nov. 2007.

- BUZZO, C. L. *et al.* A novel pathway for inducible nitric-oxide synthase activation through inflammasomes. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 42, p. 32087–32095, 15 out. 2010.
- CHADLI, A. *et al.* Celastrol inhibits Hsp90 chaperoning of steroid receptors by inducing fibrillization of the co-chaperone p23. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 6, p. 4224–4231, 5 fev. 2010.
- CHAPPUIS, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: What are the needs for diagnosis, treatment and control? **Nature Reviews Microbiology**, v. 5, n. 11, p. 873–882, nov. 2007.
- CHAUHAN, P. *et al.* Redundant and regulatory roles for Toll-like receptors in Leishmania infection. **Clinical and Experimental Immunology**, 1 nov. 2017.
- CHIOSIS, G. *et al.* A small molecule designed to bind to the adenine nucleotide pocket of Hsp90 causes Her2 degradation and the growth arrest and differentiation of breast cancer cells. **Chemistry and Biology**, v. 8, n. 3, p. 289–299, 2001.
- CHOUDHURY, A. *et al.* Inhibition of HSP90 and Activation of HSF1 Diminish Macrophage NLRP3 Inflammasome Activity in Alcohol-Associated Liver Injury. **Alcoholism: Clinical and Experimental Research**, v. 44, n. 6, p. 1300–1311, 1 jun. 2020.
- CORTAJARENA, A. L.; YI, F.; REGAN, L. Designed TPR modules as novel anticancer agents. **ACS Chemical Biology**, v. 3, n. 3, p. 161–166, 20 mar. 2008.
- 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.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis - Current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, 2003.
- DE CARVALHO, R. V. H. *et al.* Leishmania Lipophosphoglycan Triggers Caspase-11 and the Non-canonical Activation of the NLRP3 Inflammasome. **Cell Reports**, v. 26, n. 2, p. 429- 437.e5, 8 jan. 2019.

DE MENEZES, J. P. B. *et al.* Advances in development of new treatment for leishmaniasis. **BioMed Research International**, v. 2015, 2015.

DEDET, J. P. *et al.* Cutaneous leishmaniasis. The parasite. **Clinics in Dermatology**, v. 17, n. 3, p. 261–268, maio 1999.

DONNELLY, A.; BLAGG, B. Novobiocin and Additional Inhibitors of the Hsp90 C-Terminal Nucleotide-binding Pocket. **Current Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 26, p. 2702–2717, 31 out. 2008.

FRANCHI, L. *et al.* Function of Nod-like receptors in microbial recognition and host defense. **Immunological Reviews**, v. 227, n. 1, p. 106–128, jan. 2009.

GABRIEL, Á. *et al.* Cutaneous Leishmaniasis: The Complexity of Host's Effective Immune Response against a Polymorphic Parasitic Disease. **Journal of Immunology Research**, v. 2019, 2019.

GONÇALVES, A. C. *et al.* The NLRP3 inflammasome contributes to host protection during *Sporothrix schenckii* infection. **Immunology**, v. 151, n. 2, p. 154–166, 1 jun. 2017.

GRAEFE, S. E. B. *et al.* Inhibition of HSP90 in *Trypanosoma cruzi* induces a stress response but no stage differentiation. **Eukaryotic Cell**, v. 1, n. 6, p. 936–943, dez. 2002.

GRIMALDI, G. Cutaneous leishmaniasis: clinical and immunopathological aspects. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 77, n. 2, p. 195–215, 1982.

GUEVARA, P. *et al.* Green fluorescent protein-tagged *Leishmania* in phlebotomine sand flies. **Journal of Medical Entomology**, v. 38, n. 1, p. 39–43, 2001.

GUIMARÃES-COSTA, A. B. *et al.* *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 16, p. 6748–6753, 21 abr. 2009.

HERWALDT, B. L. Leishmaniasis. **Lancet**, v. 354, n. 9185, p. 1191–1199, 2 out. 1999.



JEZ, J. M. *et al.* Crystal structure and molecular modeling of 17-DMAG in complex with human Hsp90. **Chemistry and Biology**, v. 10, n. 4, p. 361–368, 1 abr. 2003.

KIM, S. H. *et al.* Discovery of (2 S)-1-[4-(2-{6-amino-8-[(6-bromo-1,3-benzodioxol-5-yl) sulfanyl]-9 H-purin-9-yl}ethyl)piperidin-1-yl]-2-hydroxypropan-1-one (MPC-3100), a purine-based Hsp90 inhibitor. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 55, n. 17, p. 7480–7501, 13 set. 2012.

KWON, H. J. *et al.* Suppression of morphological transformation by radicicol is accompanied by enhanced gelsolin expression. **Oncogene**, v. 15, n. 21, p. 2625–2631, 1997.

LI, Q. *et al.* Apoptosis caused by Hsp90 inhibitor geldanamycin in *Leishmania donovani* during promastigote-to-amastigote transformation stage. **Parasitology Research**, v. 105, n. 6, p. 1539–1548, nov. 2009.

LIMA-JUNIOR, D. S. *et al.* Inflammasome-derived IL-1 $\beta$  production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. **Nature Medicine**, v. 19, n. 7, p. 909–915, jul. 2013.

LIMA-JUNIOR, D. S. *et al.* Dectin-1 Activation during *Leishmania amazonensis* Phagocytosis Prompts Syk-Dependent Reactive Oxygen Species Production To Trigger Inflammasome Assembly and Restriction of Parasite Replication. **The Journal of Immunology**, v. 199, n. 6, p. 2055–2068, 15 set. 2017.

LIN, L. R. *et al.* *Treponema pallidum* promotes macrophage polarization and activates the NLRP3 inflammasome pathway to induce interleukin-1 $\beta$  production 11 Medical and Health Sciences 1107 Immunology. **BMC Immunology**, v. 19, n. 1, 14 set. 2018.

LODGE, R.; DIALLO, T. O.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania donovani* lipophosphoglycan blocks NADPH oxidase assembly at the phagosome membrane. **Cellular Microbiology**, v. 8, n. 12, p. 1922–1931, dez. 2006.

LUNDGREN, K. *et al.* BIIB021, an orally available, fully synthetic small-molecule inhibitor of the heat shock protein Hsp90. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 8, n. 4, p. 921–929, 1 abr. 2009.

- MACHADO, P. R. *et al.* Miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis* in Brazil: A randomized and controlled trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 12, p. 1–6, dez. 2010.
- MACHADO, P. R. L. *et al.* Treatment of Disseminated Leishmaniasis with Liposomal Amphotericin B. **Clinical Infectious Diseases**, v. 61, n. 6, p. 945–949, 8 jun. 2015.
- MACHADO, P. *et al.* Failure of early treatment of cutaneous leishmaniasis in preventing the development of an ulcer. **Clinical infectious diseases**, v. 34, n. 12, 2002.
- MANSON-BAHR, P. E. C. Immunity in Kala-Azar. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 55, n. 6, p. 550–555, 1961.
- MARTINON, F.; BURNS, K.; TSCHOPP, J. The Inflammasome: A molecular platform triggering activation of inflammatory caspases and processing of proIL- $\beta$ . **Molecular Cell**, v. 10, n. 2, p. 417–426, 2002.
- MASCARENHAS, D. P. A.; ZAMBONI, D. S. Inflammasome biology taught by *Legionella pneumophila*. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 101, n. 4, p. 841–849, abr. 2017.
- MELLATYAR, H. *et al.* Targeted cancer therapy through 17-DMAG as an Hsp90 inhibitor: Overview and current state of the art. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 102, p. 608–617, 1 jun. 2018.
- MIRANDA, M. M. *et al.* Kaurenoic acid possesses leishmanicidal activity by triggering a NLRP12/IL-1  $\beta$ /cNOS/NO Pathway. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.
- MORADIN, N.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* promastigotes: building a safe niche within macrophages. **Frontiers in cellular and infection microbiology - Front Cell Infect Microbiol**, 2012.
- MOREIRA, R. B. *et al.* AIM2 inflammasome is associated with disease severity in tegumentary leishmaniasis caused by *Leishmania (V.) braziliensis*. **Parasite Immunology**, v. 39, n. 7, 1 jul. 2017.
- MURILLO-SOLANO, C. *et al.* Identification and characterization of the antiplasmodial activity of Hsp90 inhibitors. **Malaria Journal**, v. 16, n. 1, 19 jul. 2017.

MURRAY, H. W. Clinical and experimental advances in treatment of visceral leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 45, n. 8, p. 2185–2197, 2001.

NAUSEEF, W. M. Assembly of the phagocyte NADPH oxidase. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 122, n. 4, p. 277–291, out. 2004.

NIZAMI, S. *et al.* Inhibition of the NLRP3 inflammasome by HSP90 inhibitors. **Immunology**, v. 162, n. 1, p. 84–91, 1 jan. 2020.

OLIVEIRA, L. F. *et al.* Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica**, maio 2011.

PALLAVI, R. *et al.* Heat shock protein 90 as a drug target against protozoan infections: Biochemical characterization of HSP90 from plasmodium falciparum and Trypanosoma evansi and evaluation of its inhibitor as a candidate drug. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 49, p. 37964–37975, 3 dez. 2010.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION - PAHO/WHO. **Leishmaniases. Epidemiological Report of the Americas, December 2019**. Disponível em: <<https://iris.paho.org/handle/10665.2/51734>>.

PATWARDHAN, C. A. *et al.* Gedunin inactivates the co-chaperone p23 protein causing cancer cell death by apoptosis. **Journal of Biological Chemistry**, v. 288, n. 10, p. 7313–7325, 8 mar. 2013.

PETERS, N. C. *et al.* In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v. 321, n. 5891, p. 970–974, 15 ago. 2008.

PETERSEN, A. L. DE O. A. *et al.* 17-AAG Kills Intracellular Leishmania amazonensis while Reducing Inflammatory Responses in Infected Macrophages. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 13 nov. 2012.

PIIPPO, N. *et al.* Hsp90 inhibition as a means to inhibit activation of the NLRP3 inflammasome. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.

PISCOPO, T. V.; AZZOPARDI, C. M. Leishmaniasis. **Postgraduate Medical Journal**, v. 83, n. 976, p. 649–657, fev. 2007.

- PRODROMOU, C. *et al.* Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. **Cell**, v. 90, n. 1, p. 65–75, 11 jul. 1997.
- PULVERTAFT, R. J. V. Stages in the life-cycle of *Leishmania donovani*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 54, n. 2, p. 191–192, 1960.
- RITMEIJER, K. *et al.* A comparison of miltefosine and sodium stibogluconate for treatment of visceral leishmaniasis in an Ethiopian population with high prevalence of HIV infection. **Clinical Infectious Diseases**, v. 43, n. 3, p. 357–364, 1 ago. 2006.
- ROGERS, M. *et al.* Proteophosphoglycans regurgitated by *Leishmania*-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 8, ago. 2009.
- RÖHL, A.; ROHRBERG, J.; BUCHNER, J. The chaperone Hsp90: Changing partners for demanding clients. **Trends in Biochemical Sciences**, maio 2013.
- ROMERO, G. A. S. *et al.* Comparison of cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *L. (V.) guyanensis* in Brazil: Therapeutic response to meglumine antimoniate. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 5, p. 456–465, 2001.
- SACKS, D.; KAMHAWI, S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in Leishmaniasis. **Annual Review of Microbiology**, v. 55, p. 453–483, 2001.
- SAMUNI, Y. *et al.* Reactive oxygen species mediate hepatotoxicity induced by the Hsp90 inhibitor geldanamycin and its analogs. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 48, n. 11, p. 1559–1563, jun. 2010.
- 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.

SAWAYA, B. P.; BRIGGS, J. P.; SCHNERMANN, J. Amphotericin B nephrotoxicity: The adverse consequences of altered membrane properties. **Journal of the American Society of Nephrology**, 1995.

SCHOPF, F. H.; BIEBL, M. M.; BUCHNER, J. The HSP90 chaperone machinery. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**. 1 jun. 2017.

SCHULTE, T. W.; NECKERS, L. M. The benzoquinone ansamycin 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin binds to HSP90 and shares important biologic activities with geldanamycin. **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 42, n. 4, p. 273–279, 1998.

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

SHEN, G.; BLAGG, B. S. J. Radester, a novel inhibitor of the Hsp90 protein folding machinery. **Organic Letters**, v. 7, n. 11, p. 2157–2160, 26 maio 2005.

SHEPPE, A. E. F. *et al.* PGE2 Augments Inflammasome Activation and M1 Polarization in Macrophages Infected With Salmonella Typhimurium and Yersinia enterocolitica. **Frontiers in Microbiology**, v. 9, 31 out. 2018.

SIDERA, K.; PATSAVOUDI, E. HSP90 Inhibitors: Current Development and Potential in Cancer Therapy. **Recent Patents on Anti-Cancer Drug Discovery**, v. 9, n. 1, p. 1–20, 13 mar. 2014.

SOGA, S. *et al.* KF25706, a novel oxime derivative of radicicol, exhibits in vivo antitumor activity via selective depletion of Hsp90 binding signaling molecules. **Cancer Research**, v. 59, n. 12, p. 2931–8, jun. 1999.

STEBBINS, C. E. *et al.* Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: Targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. **Cell**, v. 89, n. 2, p. 239–250, 18 abr. 1997.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Leishmaniasis: An update of current pharmacotherapy. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 14, n. 1, p. 53–63, jan. 2013.

- SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 16, n. 2, p. 237–252, 1 fev. 2015.
- SUNDAR, S. *et al.* Single-Dose Liposomal Amphotericin B for Visceral Leishmaniasis in India. **New England Journal of Medicine**, v. 362, n. 6, p. 504–512, 11 fev. 2010.
- SUNDAR, S. *et al.* Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: Report from the center of the Indian epidemic. **Clinical Infectious Diseases**, v. 31, n. 4, p. 1104–1107, 2000.
- SUNDAR, S.; MURRAY, H. W. Availability of miltefosine for the treatment of kala-azar in India. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 83, n. 5, p. 394–395, maio 2005.
- SUNDAR, S.; SINGH, A. Chemotherapeutics of visceral leishmaniasis: Present and future developments. **Parasitology**, v. 145, n. 4, p. 481–489, 1 abr. 2018.
- TEIXEIRA, C. R. *et al.* Saliva from *Lutzomyia longipalpis* Induces CC Chemokine Ligand 2/Monocyte Chemoattractant Protein-1 Expression and Macrophage Recruitment. **The Journal of Immunology**, v. 175, n. 12, p. 8346–8353, 15 dez. 2005.
- THEODORAKI, M. A.; CAPLAN, A. J. Quality control and fate determination of Hsp90 client proteins. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular Cell Research**, v. 1823, n. 3, p. 683–688, mar. 2012.
- TIUMAN, T. S. *et al.* Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, n. 8, ago. 2011.
- TOMIOTTO-PELLISSIER, F. *et al.* Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. **Frontiers in immunology**, 2018.
- TRENDOWSKI, M. PU-H71: An improvement on nature's solutions to oncogenic Hsp90 addiction. **Pharmacological Research**, v. 99, p. 202–216, 14 jul. 2015.
- UEHARA, Y. *et al.* Phenotypic change from transformed to normal induced by benzoquinonoid ansamycins accompanies inactivation of p60src in rat kidney cells infected with Rous sarcoma virus. **Molecular and Cellular Biology**, v. 6, n. 6, p. 2198–2206, jun. 1986.

VAJJHALA, P. R.; MIRAMS, R. E.; HILL, J. M. Multiple binding sites on the pyrin domain of ASC protein allow self-association and interaction with NLRP3 protein. **Journal of Biological Chemistry**, v. 287, n. 50, p. 41732–41743, 7 dez. 2012.

VALÉRIO-BOLAS, A. *et al.* Intracellular and extracellular effector activity of mouse neutrophils in response to cutaneous and visceral Leishmania parasites. **Cellular Immunology**, v. 335, p. 76–84, 1 jan. 2019.

VARELA-M, R. E. *et al.* The HSP90 inhibitor 17-AAG potentiates the antileishmanial activity of the ether lipid edelfosine. **Acta Tropica**, v. 131, n. 1, p. 32–36, mar. 2014.

WHITESELL, L. *et al.* Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60(v-src) heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: Essential role for stress proteins in oncogenic transformation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 91, n. 18, p. 8324–8328, 1994.

WIESGIGL, M.; CLOS, J. Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in Leishmania donovani. **Molecular Biology of the Cell**, v. 12, n. 11, p. 3307–3316, 2001.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. WHO. **Neglected tropical diseases**. Disponível em: <<https://www.who.int/data/gho/data/themes/neglected-tropical-diseases>>.

WORTMANN, G. *et al.* Liposomal amphotericin B for treatment of cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 83, n. 5, p. 1028–1033, nov. 2010.

ZAMBONI, D. S.; LIMA-JUNIOR, D. S. Inflammasomes in host response to protozoan parasites. **Immunological Reviews**, v. 265, n. 1, p. 156–171, 1 maio 2015.

ZHAO, J. F.; NAKANO, H.; SHARMA, S. Suppression of RAS and MOS transformation by radicicol. **Oncogene**, v. 11, n. 1, p. 161–173, 1995.

ZHAO, R.; HOURY, W. A. Hsp90: A chaperone for protein folding and gene regulation. **Biochemistry and Cell Biology**, v. 83, n. 6, p. 703–710, dez. 2005.

## **APÊNDICE**

- 9.1 ARTIGO CIENTÍFICO PUBLICADO NA REVISTA SCIENTIFIC REPORTS
- 9.2 INVENTORA NO PEDIDO DE PATENTE (BR102020018304-4)
- 9.3 COLABORAÇÕES EM ARTIGOS CIENTÍFICOS



## 9.1 Artigo científico publicado na revista *Scientific Reports*

Luana Carneiro Palma, Luiz Felipe Gomes Rebello Ferreira, Antonio Luis de Oliveira Almeida Petersen, Beatriz Rocha Simões Dias, Juliana Perrone Bezerra de Menezes, Diogo Rodrigo de Magalhães Moreira, Marcelo Zaldini Hernandez e Patricia Sampaio Tavares Veras. **A docking-based structural analysis of geldanamycin-derived inhibitor binding to human or *Leishmania* Hsp90.** *Scientific Reports*, (2019) 9:14756.

OPEN

# A docking-based structural analysis of geldanamycin-derived inhibitor binding to human or *Leishmania* Hsp90

Luana Carneiro Palma<sup>1</sup>, Luiz Felipe Gomes Rebello Ferreira<sup>2</sup>, Antonio Luis de Oliveira Almeida Petersen<sup>1</sup>, Beatriz Rocha Simões Dias<sup>1</sup>, Juliana Perrone Bezerra de Menezes<sup>1</sup>, Diogo Rodrigo de Magalhães Moreira<sup>3</sup>, Marcelo Zaldini Hernandez<sup>2</sup> & Patricia Sampaio Tavares Veras<sup>1</sup>

Leishmaniasis is a neglected disease that affects millions of individuals around the world. Regardless of clinical form, treatment is based primarily on the use of pentavalent antimonials. However, such treatments are prolonged and present intense side effects, which lead to patient abandonment in many cases. The search for chemotherapeutic alternatives has become a priority. Heat Shock Protein 90 (Hsp90) inhibitors have recently come under investigation due to antiparasitic activity in *Plasmodium* sp., *Trypanosoma* sp. and *Leishmania* sp. Some of these inhibitors, such as geldanamycin and its analogs, 17-AAG and 17-DMAG, bind directly to Hsp90, thereby inhibiting its activity. Previous studies have demonstrated that different parasite species are more susceptible to some of these inhibitors than host cells. We hypothesized that this increased susceptibility may be due to differences in binding of Hsp90 inhibitors to *Leishmania* protein compared to host protein. Based on the results of the *in silico* approach used in the present study, we propose that geldanamycin, 17-AAG and 17-DMAG present an increased tendency to bind to the N-terminal domain of *Leishmania amazonensis* Hsp83 in comparison to human Hsp90. This could be partially explained by differences in intermolecular interactions between each of these inhibitors and Hsp83 or Hsp90. The present findings demonstrate potential for the use of these inhibitors in the context of anti-*Leishmania* therapy.

Leishmaniasis, a disease caused by the protozoan parasite of the *Leishmania* genus, typically manifests, depending on the parasite species, in three main clinical forms: visceral, cutaneous or mucocutaneous<sup>1</sup>. Despite its wide distribution around the world, leishmaniasis is considered a neglected tropical disease that is endemic in 98 countries<sup>2</sup>. Regardless of clinical form, antileishmanial therapy is predominantly based on the use of pentavalent antimonials and amphotericin B. Unfortunately, these drugs present high toxicity and severe side effects, in addition to necessitating extended courses of treatment that often result in abandonment<sup>3,4</sup>. Due to decreased side effects, treatment with liposomal amphotericin B has been adopted in some developed countries, but the high cost of this therapy restricts its usage in large populations<sup>5</sup>. Thus, the search for highly effective and less toxic alternatives has become a priority.

To this end, Heat Shock Protein 90 (Hsp90) inhibitors, classically employed in cancer treatment, have recently come under investigation with respect to leishmaniasis treatment<sup>6,7</sup>. Hsp90, a highly conserved molecular chaperone expressed by eubacteria and all eukaryotes, plays an important role in maintaining cellular homeostasis. In *Leishmania* spp., Hsp90 ortholog is also named as Hsp83. Importantly, this protein participates in the correct folding of its client proteins, such as transcription factors and protein kinases, mainly involved in cell cycle regulation and cell signaling pathways<sup>8</sup>. Structurally, Hsp90 is a homodimer, in which each monomer is formed by three distinct domains: the N-terminal domain (NTD) that contains its ATP binding site, the middle domain, which is

<sup>1</sup>Gonçalo Moniz Institute, FIOCRUZ, Laboratory of Parasite – Host Interaction and Epidemiology, Salvador, 40296-710, Brazil. <sup>2</sup>Federal University of Pernambuco, Department of Pharmaceutical Sciences, Recife, 50670-901, Brazil. <sup>3</sup>Gonçalo Moniz Institute, FIOCRUZ, Laboratory of Tissue Engineering and Immunopharmacology, Salvador, 40296-710, Brazil. Correspondence and requests for materials should be addressed to P.S.T.V. (email: [patricia.veras@fiocruz.br](mailto:patricia.veras@fiocruz.br))

the main binding site for its client proteins, as well as some co-chaperones that aid Hsp90 in protein folding, and the C-terminal domain that is the critical site for both client-binding and the dimer formation of Hsp90<sup>9</sup>. During the molecular cycle of Hsp90, the protein undergoes several conformational alterations: after ATP binding to the NTD, Hsp90 reaches the first intermediate state by repositioning a lid segment, which leads to concomitant structural changes that result in the dimerization of the NTDs. These domains then become associated with M-domains, and in its second intermediate state, the chaperone assumes a closed conformation, in which ATP hydrolysis and ADP release occur. Finally, Hsp90 forms a large protein complex together with client proteins and co-chaperones, which play the pivotal role of regulating Hsp90 activity<sup>10</sup>.

The inhibition of Hsp90 results in drastic consequences to eukaryotic cells, as it leads to the formation of poorly-folded proteins that will ultimately be degraded via the proteasome proteolytic pathway, there by interfering with cell growth and survival<sup>11</sup>. Several compounds are known to inhibit Hsp90 activity. These can act directly by affecting Hsp90 binding, or indirectly, through the inhibition of Hsp90 co-chaperones<sup>12</sup>. Geldanamycin (GA), an antibiotic from the benzoquinone ansamycin family, is obtained via fermentation of the bacterium *Streptomyces hygroscopicus*. Chemically, GA is formed by a planar macrocyclic ansa bridge structure linked to a quinone moiety. GA binds directly to Hsp90, more specifically to this protein's ATP binding site present in the NTD<sup>13–15</sup>. Several GA analogues have been synthesized, including 17-allylamino-17-demethoxy geldanamycin (17-AAG) and 17-dimethylamino ethylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-DMAG). Both compounds arise from the inclusion of different amines in the non-essential methoxyl group present on carbon 17 and, similarly to GA, both bind to the ATP binding site in the NTD of Hsp90<sup>16,17</sup>.

Recent studies have demonstrated interference by GA and its analogues on the growth and survival of a variety of protozoan parasites. GA treatment was shown to inhibit the growth of intracellular *Plasmodium falciparum* in infected erythrocytes. Pull-down experiments revealed that GA also binds specifically to *P. falciparum* Hsp90 and this inhibitor showed a higher binding ability to parasite Hsp90 than to human Hsp90<sup>18</sup>. Pallavi, *et al.*<sup>18</sup> further demonstrated that 17-AAG inhibited the growth of *P. falciparum* isolated from patients. More recently, Murillo-Solano, *et al.*<sup>19</sup> demonstrated that GA, 17-AAG and 17-DMAG suppressed the growth of *P. falciparum* at concentrations shown to be non-toxic to host cells. In a murine model of trypanosomiasis, *Trypanosoma evansi* growth was inhibited in mice treated with 17-AAG in comparison to control animals that only received the vehicle<sup>18</sup>. In addition, Pizarro *et al.*<sup>20</sup> demonstrated that a number of ligands, including GA, inhibited the growth of *Trypanosoma brucei* and bound strongly to the Hsp83 of this parasite.

The treatment of *Leishmania donovani* promastigotes by GA was shown to result in the inhibition of parasite growth in a dose-dependent manner<sup>21</sup>. Li *et al.*<sup>22</sup> also demonstrated that GA induced apoptosis in axenic *L. donovani* promastigotes. Moreover, the treatment of axenic *L. braziliensis* promastigotes with 17-AAG induced parasite death in a dose-dependent manner. A similar effect was observed in macrophages infected by *L. braziliensis*, in which 17-AAG caused a significant reduction in parasite load *in vitro*<sup>7</sup>. Recently, derivatives of rebastatin, a GA-related compound, have been shown to bind to *L. braziliensis* Hsp83 and exert inhibitory activity over this protein<sup>23</sup>. Treatment with 17-AAG was further shown to reduce the percentage of macrophages infected by *L. amazonensis*, as well as the number of intracellular parasites; these effects occurred at doses that were not even remotely toxic to macrophages. Moreover, while 17-AAG not only killed parasite promastigotes, known to colonize the insect vector, it also neutralized the amastigote forms found within intracellular compartments in host cells. These leishmanicidal effects on intracellular parasites were shown to be irreversible and independent of the production of nitric oxide, superoxide or pro-inflammatory molecules by macrophages<sup>6</sup>.

Taken together, these findings provide convincing evidence that *Leishmania* presents higher susceptibility to Hsp90 inhibitors than host macrophages. Accordingly, we hypothesized that this phenomenon might be due to differences in intermolecular interactions occurring between GA-derived Hsp90 inhibitors and parasite Hsp83, in comparison to host Hsp90.

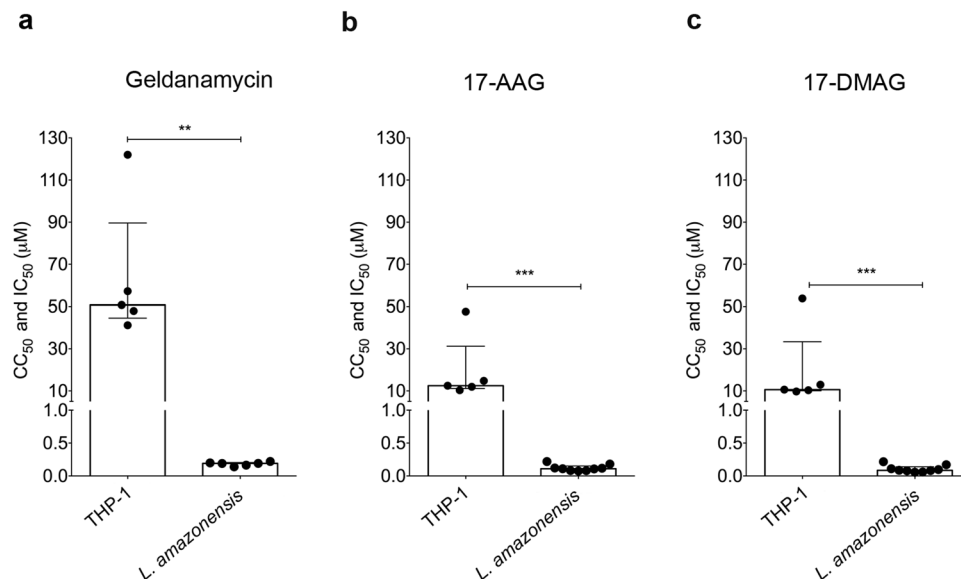
To test this hypothesis, we initially performed a cell viability assay to evaluate differences in susceptibility to GA-derived Hsp90 inhibitors by comparing *L. amazonensis* promastigotes to a human macrophage cell-line. We employed an *in silico* approach via molecular docking to investigate the types of chemical interactions produced during the binding of these inhibitors to the NTD of Hsp90 in parasites and host cells.

Using a computational model, we demonstrated that the GA class of compounds (GA, 17-AAG and 17-DMAG) presents an increased tendency to bind to the NTD of parasite Hsp83 compared to the NTD of human Hsp90, which may, in part, explain the strong and selective antiparasitic activity exhibited by these anti-leishmanials.

## Results

### ***L. amazonensis* presents greater susceptibility to Hsp90 inhibitors than the differentiated THP-1 cell-line.**

Initially, we evaluated differences in parasite and host cell susceptibility to Hsp90 inhibitors. Cell viability assays evaluating the leishmanicidal activity and cytotoxicity (THP-1 cell-line) of GA, 17-AAG and 17-DMAG revealed that GA reduced parasite cellular viability by 50% at a concentration of 0.1910  $\mu\text{M}$  (Q1: 0.16  $\mu\text{M}$  and Q3: 0.20  $\mu\text{M}$ ), versus a concentration of 50.77  $\mu\text{M}$  (Q1: 44.57  $\mu\text{M}$  and Q3: 89.62  $\mu\text{M}$ ) for the THP-1 cell-line ( $p = 0.0043$ ) (Fig. 1a). This data was used to calculate the selectivity index (SI) of GA at 266, i.e. 266 times more GA is needed to kill 50% of the THP-1 cell-line compared to 50% of the *L. amazonensis* promastigotes. 17-AAG was shown to reduce parasite viability by 50% at a concentration of 0.1105  $\mu\text{M}$  (Q1: 0.08  $\mu\text{M}$  and Q3: 0.15  $\mu\text{M}$ ), while a significantly higher  $\text{CC}_{50}$  value of 12.47  $\mu\text{M}$  (Q1: 11.17  $\mu\text{M}$  and Q3: 31.22  $\mu\text{M}$ ) was calculated for the THP-1 cell-line ( $p = 0.001$ ) (Fig. 1b), resulting in an SI of 113 for 17-AAG. The  $\text{IC}_{50}$  value for 17-DMAG was 0.0861  $\mu\text{M}$  (Q1: 0.07  $\mu\text{M}$  and Q3: 0.14  $\mu\text{M}$ ) with respect to *L. amazonensis* promastigotes as compared to a  $\text{CC}_{50}$  value of 10.60  $\mu\text{M}$  (Q1: 10.04  $\mu\text{M}$  and Q3: 33.39  $\mu\text{M}$ ) for the THP-1 cell-line ( $p = 0.001$ ) (Fig. 1c), resulting in a corresponding SI of 123. GA presented the highest SI when compared to 17-AAG or 17-DMAG. Taken together, these results indicate that all the inhibitors evaluated clearly presented much higher toxicity against *L.*



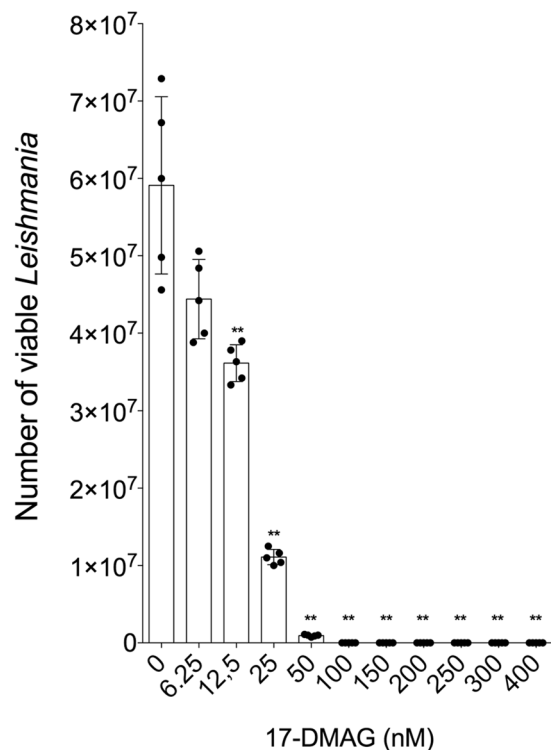
**Figure 1.** *L. amazonensis* presents greater susceptibility to Hsp90 inhibitors than the differentiated THP-1 cell-line. *L. amazonensis* axenic promastigotes and differentiated THP-1 cells were treated with (a) GA, (b) 17-AAG or (c) 17-DMAG in a 12-step serial dilution assay. Graphs depict IC<sub>50</sub> (*L. amazonensis*) and CC<sub>50</sub> (THP-1 cell-line) values for each respective inhibitor. Mann Whitney test \*\*\**p* = 0.001, \*\**p* = 0.0043.

*amazonensis* compared to the host cell. We also performed cytotoxicity assays on human lung fibroblasts (MRC-5 cells) treated with 17-AAG or 17-DMAG. We observed that, as in THP-1 cells, the inhibitors tested were shown to be non-toxic, with a CC<sub>50</sub> of 13.24 µM for 17-DMAG and 86.15 µM for 17-AAG (Supplementary Fig. S1). To evaluate whether the toxicity observed in promastigotes would also be seen in amastigotes, we performed an intracellular viability assay in infected macrophages and treated with 17-DMAG. As in promastigotes, 17-DMAG also presented high toxicity to amastigotes. At concentrations over 100 nM of 17-DMAG, no viable parasites were observed. Interestingly, the IC<sub>50</sub> value obtained was as low as 13.4 nM (Fig. 2).

**Hsp90 inhibitors present different docking interactions during binding to the NTD of *L. amazonensis* Hsp83 than the NTD of human Hsp90.** Using an *in silico* approach, it was observed that *L. amazonensis* Hsp83 binding site to GA, 17-AAG and 17-DMAG was similar, as expected (Fig. 3a). Considering both the NTD of *L. amazonensis* Hsp83 model and the *Homo sapiens* Hsp90 target protein, all three compounds tested in this study formed hydrogen bonds, bridged by water molecules, with amino acid residues at the target binding site.

Taking into consideration the *L. amazonensis* Hsp83 model, modeling analysis revealed that GA (Fig. 3b) possibly formed a hydrogen bond, bridged by a water molecule, at a distance (donor-acceptor) of 3.0 Å to residue Val31, hydrogen bonds at a distance of 2.9 Å (Asn89); 3.1 Å (Gly115) and made hydrophobic contacts with residues Asn34, Asp37, Ala38, Lys41, Ile79, Gly80, Met81, Leu90, Gly118, Phe121 and Ala167. The modelling suggests that 17-AAG inhibitor (Fig. 3c) formed a hydrogen bond, bridged by a water molecule, at a distance of 2.6 Å to residue Gly118, hydrogen bonds at a distance of 3.0 Å (Asn34); 3.1 Å (Lys41); 2.9 Å (Asn89) and presented hydrophobic contacts with most of the same residues that made contact with GA, Asp37, Ala38, Ile79 and Leu90. On the other hand, the analysis revealed 17-DMAG (Fig. 3d) probably formed two hydrogen bonds, bridged by a single water molecule, at distances of 3.3 Å and 2.8 Å to residue Asn34, in addition of making hydrogen bonds with the residues Lys41 and Asn89 at a distance of 3.1 Å. Analysis indicates that 17-DMAG also made hydrophobic contacts with the residues Ile79, Met81, Leu90, Arg95, Gly97 and Gly118.

As expected, we observed that for all tested inhibitors, GA, 17-AAG and 17-DMAG, the binding site of human Hsp90 was identical (Fig. 4a). Modelling analysis also suggests that the natural compound, GA (Fig. 4b), formed hydrogen bonds, bridged by water molecules, with the following amino acid residues at 3.0 Å of distance: Leu48, Asn51, Gly97, Thr184 and Gly137, as well as made hydrophobic contacts with residues Asn55, Ile96, Met98, Asp102, Asn106, Leu107, Phe138 and Val150. In addition, the GA analogue, 17-AAG (Fig. 4c), possibly formed hydrogen bonds, bridged by water molecules, with amino acid residues at the following distances: 3.0 Å (Leu48 and Ser52), 3.6 Å (Asp54), 3.0 Å (Gly97) and 3.1 Å (Asn106 and Lys112). Also, 17-AAG made hydrophobic contacts with most of the same residues as GA: Ala55, Ile96, Met98, Asp102, Leu107, Phe138 and Val150, except for Asn51. On the other hand, 17-DMAG (Fig. 4d) probably formed hydrogen bonds, bridged by water molecules, to other amino acid residues different from GA. The distances between the compound and the amino acids were (donor-acceptor): 2.6 Å (Leu48), 3.1 Å (Ser52 and Thr184), 3.0 Å (Lys112) and 2.8 Å (Gly137). The analysis indicates that Hsp90 inhibitor also formed a hydrogen bond with residue Lys58 at a distance of 3.1 Å, in addition to a salt bridge with residue Asp54 and made hydrophobic contacts with the following residues: Ala55, Ile96, Gly97, Met98, Asp102, Asn106, Leu107 and Phe138.



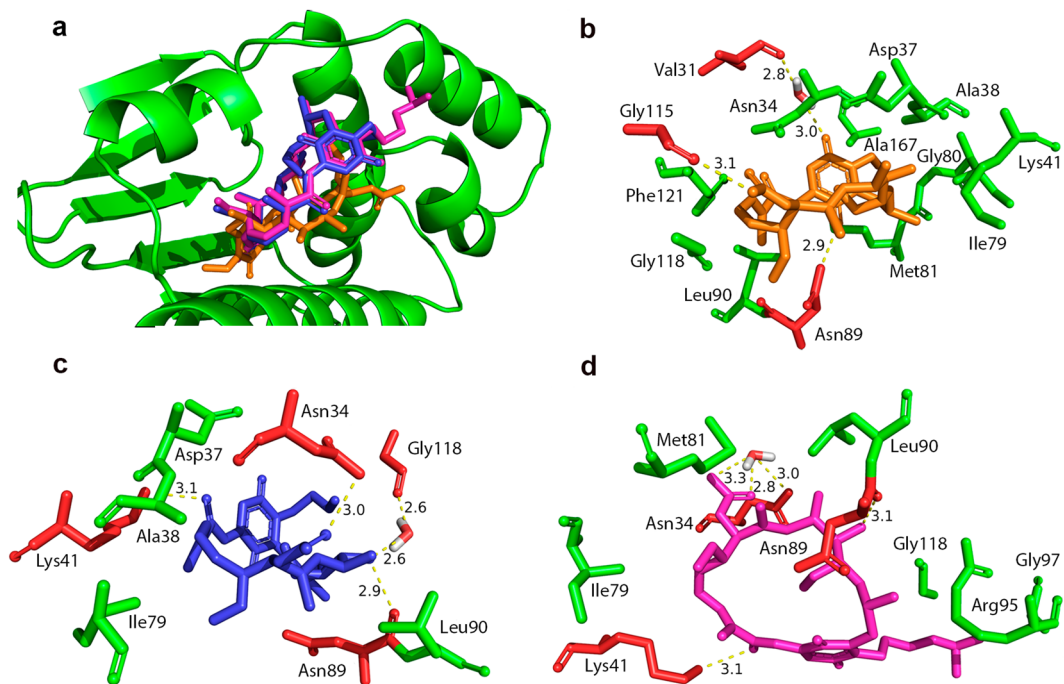
**Figure 2.** Intracellular viability of *L. amazonensis*-infected THP-1 cells treated with 17-DMAG. THP-1 cells ( $5 \times 10^5$  per well) were plated in RPMI medium with PMA (100 nM) to promote differentiation into macrophages, then infected with *L. amazonensis* promastigotes (10:1) for 6 h at 35 °C. After washing to remove non-internalized parasites, cells were treated with 17-DMAG at concentrations of 6.25 nM, 12.5 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM, 300 nM and 400 nM (five replicates per concentration) for 72 h at 35 °C. Cells were washed, Schneider's complete medium was added and, after four days at 24 °C, parasites were counted in a Neubauer chamber. Mann Whitney test  $**p < 0.01$ .

The Balloon program generated six conformer ensembles of each compound illustrated in Supplementary Material (Supplementary Fig. S2). The ChemPLP analysis scores for all six conformations of each Hsp90 inhibitor are listed in Table 1. This modelling analysis indicates that all the studied inhibitors presented higher scores when docking to the NTD of *L. amazonensis* Hsp83 than the NTD of *Homo sapiens* Hsp90: GA (73.89 vs. 54.30), 17-AAG (75.81 vs. 56.02) and 17-DMAG (78.02 vs. 54.53), respectively. Also, with the exception of 17-AAG, which the ring conformation was the same as the co-crystallized ligand former conformation, each ligand's top ranked conformation for the NTD of *L. amazonensis* Hsp83 (3H80.1.A) showed higher ChemPLP score values when compared with the top ranked conformation for the NTD of *Homo sapiens* Hsp90 (1YET).

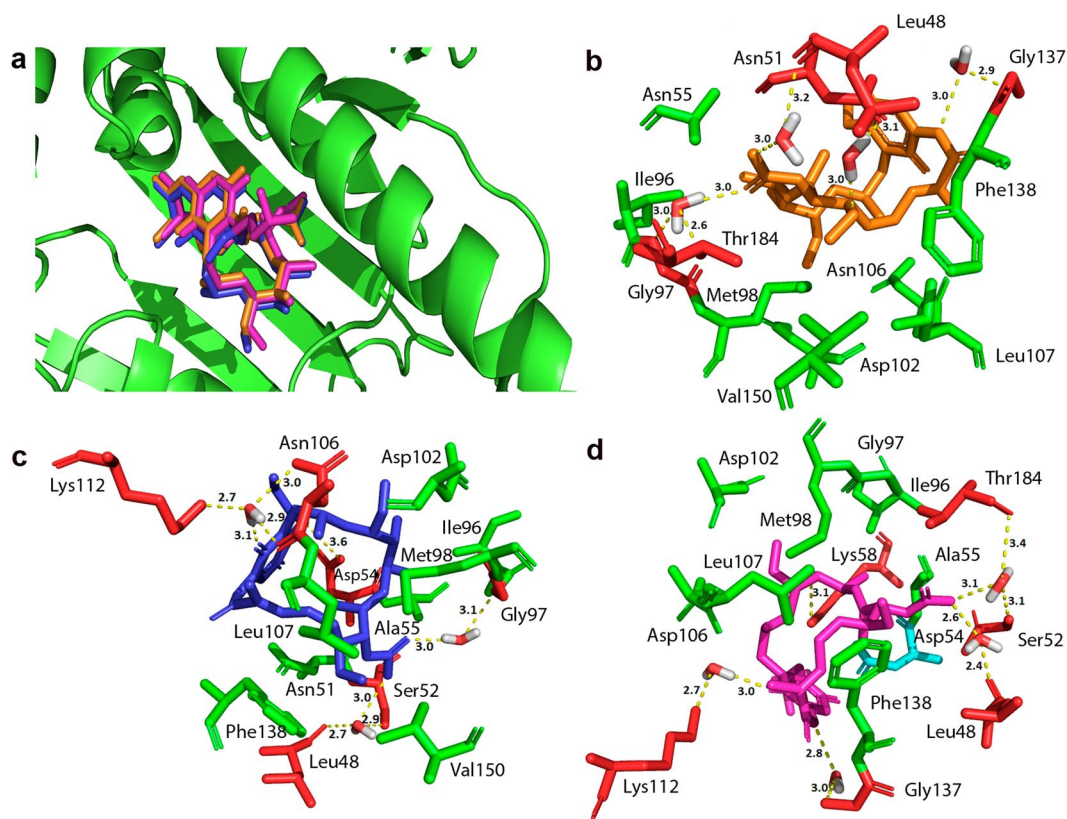
## Discussion

The treatment of leishmaniasis continues to represent a substantial challenge, since a range of disadvantages are associated with most available drugs, including severe side effects, prolonged periods of treatment and low adherence to therapy by many patients. As a result, alternative chemotherapies are under investigation in an attempt to mitigate these limitations. The present study evaluated three Hsp90 inhibitors: GA, 17-AAG and 17-DMAG, all compounds with recently recognized anti-parasitic activity. The latter two are currently undergoing clinical trials to evaluate cancer treatment.

The present report investigated differences in the susceptibility of *L. amazonensis* promastigotes and differentiated THP-1 cells to this family of Hsp90 inhibitors. Our results show that all tested inhibitors presented greater toxicity to parasites than to host cells, as evidenced by differences in  $IC_{50}$  (*Leishmania*) and  $CC_{50}$  (THP-1 cell-line) values (Fig. 1). Similarly to the present study, Murillo-Solano, *et al.*<sup>19</sup> demonstrated that GA, 17-AAG and 17-DMAG were able to inhibit the growth of *P. falciparum* at submicromolar concentrations, whereas growth inhibition in human pulmonary fibroblasts was only observed at levels over 10  $\mu$ M. In addition, *L. amazonensis* and *L. braziliensis* promastigotes were also found to be more susceptible to treatment with 17-AAG than murine macrophages<sup>6,7</sup>. Moreover, the elevated SI values observed for each inhibitor (GA: 266; 17-AAG: 113; 17-DMAG: 123) further serve to confirm the observed differences in susceptibility between parasites and host cells with regard to treatment involving these compounds. Of the three inhibitors, the highest selectivity index values were obtained from GA, seemingly suggesting that this inhibitor could be an optimal choice for use in future studies. However, since GA treatment has been associated with hepatotoxicity, taken together with compound's low water solubility and chemical instability, it is considered infeasible as a leishmaniasis treatment<sup>24</sup>. 17-AAG and 17-DMAG, both synthesized from GA, exhibit lower toxicity and, in the case of 17-DMAG, greater solubility in



**Figure 3.** *L. amazonensis* Hsp83 binding site with inhibitors and interaction types. (a) *L. amazonensis* Hsp83 binding site with GA (orange), 17-AAG (blue) and 17-DMAG (magenta). (b) GA (orange), (c) 17-AAG (blue) and (d) 17-DMAG (magenta) and the Hsp83 residues that make hydrophobic contacts (green) and hydrogen bonds (red).



**Figure 4.** *Homo sapiens* Hsp90 binding site with inhibitors and interaction types. (a) *Homo sapiens* Hsp90 binding site with GA (orange), 17-AAG (blue) and 17-DMAG (magenta). (b) GA (orange), (c) 17-AAG (blue) and (d) 17-DMAG (magenta) and the Hsp90 residues that formed hydrophobic contacts (green), salt bridges (cyan) and hydrogen bonds (red).

Inhibitor		Conformation 1	Conformation 2	Conformation 3	Conformation 4	Conformation 5	Conformation 6	Average
GA	La Hsp83	73.48	74.37	83.16	72.13	70.51	69.67	73.89
	Human Hsp90	73.38	52.45	48.68	51.51	46.62	53.14	54.30
17-AAG	La Hsp83	65.83	81.82	73.75	79.50	72.50	81.47	75.81
	Human Hsp90	70.05	47.94	46.34	63.80	51.19	56.80	56.02
17-DMAG	La Hsp83	81.79	80.58	85.35	69.12	73.13	78.17	78.02
	Human Hsp90	68.85	51.11	50.94	54.94	52.38	48.97	54.53

**Table 1.** ChemPLP scores for each inhibitor and its respective conformations when bound to the NTDs of *L. amazonensis* Hsp83 or human Hsp90.

water than GA, which increases the likelihood of use in future studies<sup>25</sup>. In sum, these observations regarding differences in susceptibility between parasites and host cells reinforce the idea that Hsp90 represents a druggable target for the development of novel antileishmanials.

Based on strong evidence demonstrating interactions between the GA family of compounds and Hsp90, we postulated that human and parasitic proteins may present differences upon binding with these compounds.

Using an *in silico* approach, we evaluated interactions between GA, 17-AAG or 17-DMAG, and the NTDs of *L. amazonensis* Hsp83 or human Hsp90. With respect to the NTD of *L. amazonensis* Hsp83, the analysis suggested that all three inhibitors formed both direct and water-bridged hydrogen bonds and hydrophobic contacts with several residues (Fig. 3). By contrast, all three inhibitors formed numerous hydrogen bonds, most of them being water-bridged, upon interaction with the NTD of human Hsp90, in addition to making hydrophobic contacts with several residues common to each compound (Fig. 4). The water-mediated hydrogen bonds between ligands and the amino acid residues of the NTD of trypanosomatid Hsp83 seems to be important, as it “mimics the position of one of the phosphate groups of ATP”, as seen in a study that analyzed the molecular interactions between compounds and the NTD of *T. brucei* Hsp83<sup>20</sup>. Additionally, another study by Nilapwar *et al.* indicated that water-mediated hydrogen bonds, direct bridging or forming a network of water molecules, can reduce “the value of the  $\Delta C_p$  through a net reduction in rotational and vibrational bonding modes”<sup>26</sup>. Furthermore, in accordance with these authors’ findings, there seems to be commonality with regard to the position of water molecules found at the binding site of crystal structures of the NTD of Hsp90, available at the Protein Data Bank (PDB), which reinforces the importance of these water-mediated hydrogen bonds. The numerous hydrogen bonds water-bridged, observed in interactions between the NTD of human Hsp90 and GA, 17-AAG or 17-DMAG, do not offer a similar stabilizing effect when compared to the hydrogen bonds that formed directly between these compounds and the target’s amino acids residues. For instance, while GA only formed water-bridged hydrogen bonds when interacting with the NTD of human Hsp90 binding site residues, this compound has performed one water-bridged hydrogen bond and two direct hydrogen bonds (not water-bridged) when interacting with the NTD *L. amazonensis* Hsp83. Additionally, when taking into account only direct hydrogen bonds interactions, the inhibitors 17-AAG and 17-DMAG have formed a single hydrogen bond non-bridged (each) with the NTD of human Hsp90 binding site, while these compounds performed two (each) non-bridged hydrogen bonds when interacting with the NTD of *L. amazonensis* Hsp83 binding site. Moreover, similarities observed in the types of interactions between each of the three inhibitors and the NTDs of *L. amazonensis* Hsp83 or human Hsp90 could be explained by the chemical similarity observed between GA and its derivatives, 17-AAG and 17-DMAG<sup>27</sup>.

Regarding the *in silico* structural analysis, based on a docking study of the interaction between these three GA-derived inhibitors and the NTDs of *L. amazonensis* Hsp83 or human Hsp90, our results identified that GA, 17-AAG and 17-DMAG may present increased tendency to bind to parasite Hsp83 in comparison to human Hsp90 (Table 1). A previous *in vitro* study by Pizarro *et al.*<sup>20</sup> involving the compounds GA, 17-AAG and 17-DMAG found that all exhibited stronger binding to the NTD of *T. brucei* Hsp83 than to human Hsp90. In addition, crystallographic analysis revealed that other compounds that also bind to the NTD of *T. brucei* Hsp83 alter the conformation of this domain, which suggests structural flexibility in the chaperone that may influence selectivity<sup>20</sup>. Another *in vitro* study by Pallavi *et al.*<sup>18</sup> demonstrated that GA has higher binding ability to *P. falciparum* Hsp90 than to human Hsp90. Reinforcing our results, some derivatives of reblastatin, a GA-related compound, were recently shown to exhibit increased binding to *L. braziliensis* Hsp83 than to human Hsp90<sup>23</sup>. Similarly, Kanwar *et al.*<sup>28</sup> demonstrated that SNX-2112 analogs, inhibitors of Hsp90, exhibit leishmanicidal activity but are not cytotoxic to the host. These authors suggest that this may occur due to increased selectivity by the tested analogs for *Leishmania* Hsp83 in comparison to human Hsp90. With respect to the interaction of GA to *L. braziliensis* Hsp83, Silva and collaborators reported changes in binding ability when the full-length protein underwent alterations, with increased binding observed when this inhibitor was bound only to the NTD of *L. braziliensis* Hsp83<sup>29</sup>. While it is possible that the higher ChemPLP scores observed in the *in silico* docking of GA, 17-AAG and 17-DMAG to the NTD of *L. amazonensis* Hsp83 would be also observed *in vitro*, additional studies employing recombinant *L. amazonensis* Hsp83 and human Hsp90 must be performed. Finally, these findings may also be related to the nature of intermolecular interactions established between the inhibitors and their respective proteins. The presence of additional direct hydrogen bonds (not water-bridged), which interact with the NTD of *L. amazonensis* Hsp83, may offer a greater stabilizing effect than the presence of fewer direct hydrogen bonds, which was seen in binding to the NTD of human Hsp90.

In sum, the results obtained herein are consistent with previous studies demonstrating differences in susceptibility of *Leishmania* parasites and host cells to Hsp90 inhibitors, which was evidenced by higher parasite

toxicity. This finding may be justified by the higher ChemPLP scores observed when the inhibitors docked to the NTD of parasite Hsp83. Nonetheless, future *in vitro* studies should be conducted to evaluate the binding of these three inhibitors to recombinant parasite Hsp83 versus human Hsp90. Importantly, our study did not consider the effects of conformational changes in the NTD and/or additional Hsp90 domains caused by the inhibitors, which would likely influence the binding ability of the GA-derived inhibitors to parasite Hsp83 in comparison to human Hsp90.

The present study demonstrated that, in addition to previous reports regarding GA and 17-AAG<sup>6,7</sup>, 17-DMAG also demonstrates substantial anti-leishmanial activity. The findings presented herein may justify the increased tendency of these inhibitors to bind to the NTD of parasite Hsp83 than to that of human Hsp90, and provides support for the further study of this family of Hsp90 inhibitors in the development of novel antileishmanials.

## Methods

**Parasites.** Parasites of *L. amazonensis* (MHOM/Br88/Ba-125) were obtained from the Laboratory of Host - Parasite Interaction and Epidemiology - Gonçalo Moniz Institute (Bahia-Brazil). Axenic *L. amazonensis* promastigotes were grown in Schneider's Insect Medium (Sigma, St. Louis, MO, USA) supplemented with 50 µg/mL gentamicin (Gibco, Grand Island, NY, USA) and 10% fetal bovine serum (Gibco, Grand Island, NY, USA). Cultures were maintained in an incubator at 24 °C until *in vitro* experiments were performed.

**THP-1 and MRC-5 cell-line.** Monocytic human THP-1 cells and MRC-5 cells were grown in Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 medium (Gibco, Grand Island, NY, USA) supplemented with 2 g/L sodium bicarbonate (Sigma, St Louis, MO, USA), 25 mM N-2-hydroxyethyl piperazine-N'-2-ethane-sulfonic acid (HEPES)(Sigma, St Louis, MO, USA), 1 mM sodium pyruvate (Sigma, UK), 2 mM glutamine (Gibco, Grand Island, NY, USA), 20 g/mL ciprofloxacin (Isofarma, Precabura, CE, BR) and 10% fetal bovine serum (Gibco, Grand Island, NY, USA). Cultures were kept in an incubator under 5% CO<sub>2</sub> at 37 °C until the time of compound toxicity assessment.

**Anti-Leishmania assay.** Axenic *L. amazonensis* promastigotes in logarithmic phase were distributed on 96-well plates (4 × 10<sup>5</sup> parasites/well) in Schneider's complete medium and treated with GA (Invivogen, San Diego, CA, USA), 17-AAG (LC Laboratories, Woburn, MA, USA) or 17-DMAG (LC Laboratories, Woburn, MA, USA) in 12-step serial dilutions (1:2) at an initial concentration of 2 µM. After 72 h of treatment at 24 °C, parasites were incubated with 10% Alamar Blue<sup>®</sup> (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) for 1 h 30 min. Optical density (OD) was then read at the wavelengths of 570 and 600 nm in a spectrophotometer (SPECTRA Max 340 PC) to determine cell viability, expressed in percentage terms, used to calculate the IC<sub>50</sub> values. These were determined by applying sigmoidal regression to the concentration-response curves using GraphPad Prism v5.0<sup>30</sup> from at least three independent experiments performed in triplicates.

**Cytotoxicity assay.** Human THP-1 cells were centrifuged at 300 × g for 10 min at 4 °C and resuspended (10<sup>5</sup> cells/100 µL) in complete RPMI medium containing 100 nM phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA), then distributed on 96-well plates. Cell cultures were incubated at 37 °C for 72 h to induce macrophage differentiation. The wells were then washed twice with saline, the complete RPMI medium (without PMA) was replenished and all cells were reincubated at 37 °C for an additional 48 h. Cultures were then treated with GA, 17-AAG or 17-DMAG in 12-step serial dilutions (1:2) using an initial concentration of 50 µM. After 72 h of treatment at 37 °C, cells were then incubated with 10% Alamar Blue<sup>®</sup> for 22 h, after which plates were read at wavelengths of 570 and 600 nm in a spectrophotometer (SPECTRA Max 340 PC). The obtained data were used to calculate the percentage of cell viability and, subsequently, the CC<sub>50</sub> value was determined from sigmoidal regression of the concentration-response curves using GraphPad Prism (version 5.0) from at least three independent experiments performed in triplicate. Cytotoxicity assays were also performed with human lung fibroblasts (MRC-5 cells). To this end, MRC-5 cells were centrifuged at 300 × g for 10 min at 4 °C and plated (2.5 × 10<sup>4</sup> per well) in complete RPMI medium and left for 24 h. The cells were then treated with 17-AAG or 17-DMAG (initial concentrations: 400 µM and 50 µM, respectively) following the same protocol for THP-1 cells. After 72 h, Alamar blue<sup>®</sup> was added and the plates were read in a spectrophotometer. CC<sub>50</sub> values were determined in the same manner as for THP-1 cells.

**Intracellular viability assay.** To demonstrate the inhibitors' activity against amastigotes of *L. amazonensis*, intracellular viability assays were performed using 17-DMAG. THP-1 cells (5 × 10<sup>5</sup> per well) were plated in complete RPMI medium with PMA (100 nM) at 37 °C to promote differentiation into macrophages. After 72 h, cells were washed with saline and the medium (without PMA) was replenished. After 48 h in medium without PMA, the cells were washed again and then infected with *L. amazonensis* promastigotes in stationary phase (10:1) for 6 h. To remove non-internalized parasites, cells were washed twice with saline, the medium was replenished and concentrations of 6.25 nM, 12.5 nM, 25 nM, 50 nM, 100 nM, 150 nM, 200 nM, 250 nM, 300 nM and 400 nM (five replicates for each concentration) of 17-DMAG were added, followed by an incubation period of 72 h. Cells were then washed with saline, Schneider's complete medium was added and cultures were kept at 24 °C. After four days, parasites were counted in a Neubauer chamber and the IC<sub>50</sub> value was calculated for 17-DMAG.

**Statistical analysis.** Graphing and statistical analysis of *in vitro* data was performed using the GraphPad Prism program (version 5.0). The Mann-Whitney test was used for comparisons between two groups with non-Gaussian distribution.



**In silico approach.** The initial structure of GA was obtained from a co-crystallized complex of the NTD of human Hsp90 and GA (PDB code 1YET, available at the RCSB Protein Data Bank, <http://www.rcsb.org>). The structures of 17-AAG and 17-DMAG were constructed by performing the appropriate modifications to the obtained GA structure using the SPARTAN'08 program<sup>31</sup>. The Balloon program<sup>32</sup> was used to generate conformer ensembles for each of the three macrocyclic Hsp90 inhibitors, GA, 17-AAG and 17-DMAG. The program settings used to create these new macrocyclic ring conformations are available as Supplementary Information (Supplementary Table S1). The optimization of these conformations was carried out using the MMFF (Merck Molecular Force Field) molecular mechanics method, available in the SPARTAN'08 program, using the internal default settings for convergence criteria.

The structure of the NTD of *L. amazonensis* Hsp83 was modeled using the SWISS-MODEL homology-modeling tool<sup>33</sup> by inputting the *L. amazonensis* Hsp83 amino acid sequence available from NCBI (GenBank code AAA29250.1, available at National Center Biotechnology Information, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). The 3h80.1.A model was selected for use in this study, with 93.20% of sequence identity with the primary structure of the protein. This model has been constructed based on *L. major* Hsp83 structure as the template.

Docking analysis was carried out on each of the Hsp90 inhibitors and the NTD of human Hsp90 (PDB code 1YET), as well as modeled NTD of *L. amazonensis* Hsp83. All atoms within a radius of 15.0 Å around co-crystallized GA were considered to define the binding site location used for the analysis of the other two inhibitors. GOLD 5.2 software<sup>34</sup> was used for docking calculations using the ChemPLP score function, which is an empirical energy-based scoring function that evaluates advanced protein-ligand docking by ranking the generated ligand binding poses. Using a conformational library, the following *L. amazonensis* Hsp83 residues were treated as flexible: Asn30, Ser33, Asn34, Asp37, Lys41, Asp76, Met81, Asn89, Leu90 and Phe121; for human Hsp90, the residues treated as flexible were Leu48, Asn51, Ser52, Asp93, Met98, Asp102, Asn106, Lys112, Thr152 and Thr184. The water molecules (HOH) within the binding site were considered in our docking calculations, allowing for the translation, spin and moving of these water molecules up to a distance of 2 Å away from the initial co-crystallized position. The BINANA<sup>35</sup> program was then employed to analyze the molecular interactions resulting from docking using default settings. Finally, we used the PyMOL molecular visualization system to generate protein structure images<sup>36</sup>.

## References

- Piscopo, T. V. & Mallia Azzopardi, C. Leishmaniasis. *Postgrad Med J* **83**, 649–657 (2007).
- World Health, O. Control of the leishmaniases. *World Health Organ Tech Rep Ser*, xii–xiii, 1–186, back cover (2010).
- Croft, S. L. & Coombs, G. H. Leishmaniasis—current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol* **19**, 502–508 (2003).
- Croft, S. L. & Olliaro, P. Leishmaniasis chemotherapy—challenges and opportunities. *Clin Microbiol Infect* **17**, 1478–1483, <https://doi.org/10.1111/j.1469-0691.2011.03630.x> (2011).
- Chappuis, F. *et al.* Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nat Rev Microbiol* **5**, 873–882, <https://doi.org/10.1038/nrmicro1748> (2007).
- Petersen, A. L. *et al.* 17-AAG kills intracellular Leishmania amazonensis while reducing inflammatory responses in infected macrophages. *PLoS One* **7**, e49496, <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0049496> (2012).
- Santos, D. M. *et al.* Chemotherapeutic potential of 17-AAG against cutaneous leishmaniasis caused by Leishmania (Viannia) braziliensis. *PLoS Negl Trop Dis* **8**, e3275, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003275> (2014).
- Brown, M. A., Zhu, L., Schmidt, C. & Tucker, P. W. Hsp90—from signal transduction to cell transformation. *Biochem Biophys Res Commun* **363**, 241–246, <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.08.054> (2007).
- Zhao, R. & Houry, W. A. Hsp90: a chaperone for protein folding and gene regulation. *Biochem Cell Biol* **83**, 703–710, <https://doi.org/10.1139/o05-158> (2005).
- Li, J., Soroka, J. & Buchner, J. The Hsp90 chaperone machinery: conformational dynamics and regulation by co-chaperones. *Biochim Biophys Acta* **1823**, 624–635, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.09.003> (2012).
- Theodoraki, M. A. & Caplan, A. J. Quality control and fate determination of Hsp90 client proteins. *Biochim Biophys Acta* **1823**, 683–688, <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2011.08.006> (2012).
- Sidera, K. & Patsavoudi, E. HSP90 inhibitors: current development and potential in cancer therapy. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* **9**, 1–20 (2014).
- Whitesell, L., Mimnaugh, E. G., De Costa, B., Myers, C. E. & Neckers, L. M. Inhibition of heat shock protein HSP90-pp60v-src heteroprotein complex formation by benzoquinone ansamycins: essential role for stress proteins in oncogenic transformation. *Proc Natl Acad Sci USA* **91**, 8324–8328 (1994).
- Stebbins, C. E. *et al.* Crystal structure of an Hsp90-geldanamycin complex: targeting of a protein chaperone by an antitumor agent. *Cell* **89**, 239–250 (1997).
- Prodromou, C. *et al.* Identification and structural characterization of the ATP/ADP-binding site in the Hsp90 molecular chaperone. *Cell* **90**, 65–75 (1997).
- Schulte, T. W. & Neckers, L. M. The benzoquinone ansamycin 17-allylamino-17-demethoxygeldanamycin binds to HSP90 and shares important biologic activities with geldanamycin. *Cancer Chemother Pharmacol* **42**, 273–279, <https://doi.org/10.1007/s002800050817> (1998).
- Jez, J. M., Chen, J. C., Rastelli, G., Stroud, R. M. & Santi, D. V. Crystal structure and molecular modeling of 17-DMAG in complex with human Hsp90. *Chem Biol* **10**, 361–368 (2003).
- Pallavi, R. *et al.* Heat shock protein 90 as a drug target against protozoan infections: biochemical characterization of HSP90 from Plasmodium falciparum and Trypanosoma evansi and evaluation of its inhibitor as a candidate drug. *J Biol Chem* **285**, 37964–37975, <https://doi.org/10.1074/jbc.M110.155317> (2010).
- Murillo-Solano, C., Dong, C., Sanchez, C. G. & Pizarro, J. C. Identification and characterization of the antiplasmodial activity of Hsp90 inhibitors. *Malar J* **16**, 292, <https://doi.org/10.1186/s12936-017-1940-7> (2017).
- Pizarro, J. C. *et al.* Exploring the Trypanosoma brucei Hsp83 potential as a target for structure guided drug design. *PLoS Negl Trop Dis* **7**, e2492, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002492> (2013).
- Wiesgigl, M. & Clos, J. Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in Leishmania donovani. *Mol Biol Cell* **12**, 3307–3316 (2001).
- Li, Q. *et al.* Apoptosis caused by Hsp90 inhibitor geldanamycin in Leishmania donovani during promastigote-to-amastigote transformation stage. *Parasitol Res* **105**, 1539–1548, <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1582-y> (2009).

23. Mohammadi-Ostad-Kalayeh, S. *et al.* Heat Shock Proteins Revisited: Using a Mutasyntetically Generated Reblastatin Library to Compare the Inhibition of Human and Leishmania Hsp90s. *Chembiochem* **19**, 562–574, <https://doi.org/10.1002/cbic.201700616> (2018).
24. Neckers, L., Schulte, T. W. & Minnaugh, E. Geldanamycin as a potential anti-cancer agent: its molecular target and biochemical activity. *Invest New Drugs* **17**, 361–373 (1999).
25. Hollingshead, M. *et al.* *In vivo* antitumor efficacy of 17-DMAG (17-dimethylaminoethylamino-17-demethoxygeldanamycin hydrochloride), a water-soluble geldanamycin derivative. *Cancer Chemother Pharmacol* **56**, 115–125, <https://doi.org/10.1007/s00280-004-0939-2> (2005).
26. Nilapwar, S. *et al.* Structural–thermodynamic relationships of interactions in the N-terminal ATP-binding domain of Hsp90. *J Mol Biol* **392**, 923–936, <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2009.07.041> (2009).
27. Petrikaite, V. & Matulis, D. Inhibitor binding to Hsp90: a review of thermodynamic, kinetic, enzymatic, and cellular assays. *Curr Protein Pept Sci* **15**, 256–282 (2014).
28. Kanwar, A. *et al.* Synthesis and Activity of a New Series of Antileishmanial Agents. *ACS Med Chem Lett* **8**, 797–801, <https://doi.org/10.1021/acsmchemlett.7b00039> (2017).
29. Silva, K. P., Seraphim, T. V. & Borges, J. C. Structural and functional studies of Leishmania braziliensis Hsp90. *Biochim Biophys Acta* **1834**, 351–361, <https://doi.org/10.1016/j.bbapap.2012.08.004> (2013).
30. de Sa, M. S. *et al.* Antimalarial activity of betulinic acid and derivatives *in vitro* against Plasmodium falciparum and *in vivo* in P. berghei-infected mice. *Parasitol Res* **105**, 275–279, <https://doi.org/10.1007/s00436-009-1394-0> (2009).
31. Wavefunction Inc. Spartan'08 Tutorial and User's Guide, [www.wavefun.com/](http://www.wavefun.com/) (2008).
32. Vainio, M. J. & Johnson, M. S. Generating conformer ensembles using a multiobjective genetic algorithm. *J Chem Inf Model* **47**, 2462–2474, <https://doi.org/10.1021/ci6005646> (2007).
33. Biasini, M. *et al.* SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic Acids Res* **42**, W252–258, <https://doi.org/10.1093/nar/gku340> (2014).
34. Jones, G. *et al.* Development and Validation of a Genetic Algorithm for Flexible Docking. *Mol. Biol* **267**, 727–748, <https://doi.org/10.1006/jmbi.1996.0897> (1997).
35. Durrant, J. D. & McCammon, J. A. BINANA: a novel algorithm for ligand-binding characterization. *J Mol Graph Model* **29**, 888–893, <https://doi.org/10.1016/j.jmgm.2011.01.004> (2011).
36. DeLano, W. L. The PyMOL Molecular Graphics System, DeLano Scientific LLC, San Carlos, CA, [www.pymol.org/](http://www.pymol.org/) (2002).

## Acknowledgements

This work was supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (P.S.T.V. <http://www.fapesb.ba.gov.br>), Conselho Nacional de Pesquisa e Desenvolvimento Científico (P.S.T.V. – Universal 422867/2016-0 <http://www.cnpq.br>) and Fundação de Amparo a Ciência e Tecnologia do Estado de Pernambuco (LFGRF – BFP-0063-4.03/17). P.S.T.V. holds a grant from CNPq for productivity in research (307832/2015-5). The funders had no role in study design, data collection or analysis, the decision to publish, or preparation of the manuscript. The authors would like to thank Andris K. Walter for English language revision and manuscript copyediting assistance.

## Author Contributions

P.V., L.P. and M.H. - Conceived and designed the experiments; L.P. and L.F. - performed the experiments; L.P., L.F., A.P., B.D., J.M., D.M., M.H. and P.V. - analyzed the data; P.V. and M.H. - contributed reagents/materials/analysis tools; L.P., M.H. and P.V. – wrote the manuscript. All authors contributed to manuscript elaboration and revision and approved the final version prior to submission.

## Additional Information

**Supplementary information** accompanies this paper at <https://doi.org/10.1038/s41598-019-51239-0>.

**Competing Interests:** The authors declare no competing interests.

**Publisher's note** Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons license, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons license and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this license, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>.

© The Author(s) 2019

## **9.2 Inventora no pedido de patente (BR102020018304-4)**

Título: FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA, PROCESSO DE PRODUÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA, MEDICAMENTO, MÉTODO DE TRATAMENTO, E, USO DE UMA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA

Requerente: Fundação Oswaldo Cruz

Inventores:

Patrícia Sampaio Tavares Veras

Helvécio Vinícius Antunes Rocha

Beatriz Ferreira de Carvalho Patricio

Fabio Rocha Formiga

Kercia Pinheiro Cruz

Diana Angélica dos Santos Dantas

Marina Faillace de Amorim

Juliana Perrone Bezerra de Menezes Fullam

Cláudia Ida Brodskyn

Antonio Luis de Oliveira Almeida Petersen

Luana Carneiro Palma Gonçalves



## Outras petições - Inclusão do nome de inventor

Número do Processo: BR 10 2020 018304 4

### Dados do Depositante (71)

---

Depositante 1 de 1

**Nome ou Razão Social:** FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

**Tipo de Pessoa:** Pessoa Jurídica

**CPF/CNPJ:** 33781055000135

**Nacionalidade:** Brasileira

**Qualificação Jurídica:** Instituição de Ensino e Pesquisa

**Endereço:** AV. BRASIL, 4365, MANGUINHOS

**Cidade:** Rio de Janeiro

**Estado:** RJ

**CEP:** 21045-900

**País:** Brasil

**Telefone:** 0000-0000

**Fax:**

**Email:**

### Referência Petição

---

**Pedido :** BR102020018304-4

## Dados do Procurador

---

### Procurador:

**Nome ou Razão Social:** João Luis DOrey Facco Vianna

**Numero OAB:**

**Numero API:** 256

**CPF/CNPJ:** 60674164768

**Endereço:** Rua Teófilo Otoni, 63 - 5º ao 8º andar

**Cidade:** Rio de Janeiro

**Estado:** RJ

**CEP:** 20090-080

**Telefone:** (21) 2113-1919

**Fax:** (21) 2113-1920

**Email:** joao.vianna@kasznarleonardos.com

### Escritório:

**Nome ou Razão Social:** KASZNAR LEONARDOS PROPRIEDADE INTELECTUAL

**CPF/CNPJ:** 15305456000137

## Documentos anexados

---

Tipo Anexo	Nome
Comprovante de pagamento	GUIA INCLUSÃO P142951.pdf
Esclarecimento	ESCLARECIMENTO P141951.pdf
Procuração	substabelecimento kl.pdf
Documento de inclusão de inventor assinado	DOC INCLUSÃO INVENTOR P141951.pdf

## Declaração de veracidade

---


Declaro, sob as penas da lei, que todas as informações acima prestadas são completas e verdadeiras.

**INSTRUÇÕES:**

A data de vencimento não prevalece sobre o prazo legal. O pagamento deve ser efetuado antes do protocolo. Órgãos públicos que utilizam o sistema SIAFI devem utilizar o número da GRU no campo Número de Referência na emissão do pagamento. Processo: 1020200183044 Serviço: 260-Outras petições

**Clique aqui e pague este boleto através do Auto Atendimento Pessoa Física.**

**Clique aqui e pague este boleto através do Auto Atendimento Pessoa Jurídica.**


 Comprovante de pagamento eletrônico de boleto de cobrança


Agência/Conta débito: CITI0000336012	Valor pago: R\$36,00
Data/Hora pagamento: 22/01/2021 16:33:57	Meio de pagamento: 2CB
Nº do comprovante: 000000000000000	

**Informações para controle da Kasznar Leonardos**

Titular: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ  
Código do Titular: 33781055000135  
Endereço do Titular: AV. BRASIL, 4365  
Usuário: Daniela Ferreira Calipo  
Nosso-número: 29409161928709884  
Referência: PI - P141951/AG28817/RQ41572/211065750/JLV/DFCalipo - CO29326571  
Descrição: Apresentação de Documentos - BR 10 2020 018304 4 de 08/09/20

Recibo do Pagador

 <b>BANCO DO BRASIL</b>	<b>001-9</b>	<b>00190.00009 02940.916196 28709.884176 8 85370000003600</b>
Nome do Pagador/CPF/CNPJ/Endereço FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ CPF/CNPJ: 33781055000135 AV BRASIL 4365 MANGUINHOS, RIO DE JANEIRO -RJ CEP:21045900		
Sacador/Avalista		
Nosso-Número 29409161928709884	Nr. Documento 29409161928709884	Data de Vencimento 20/02/2021
Valor do Documento 36,00		(=) Valor Pago
Nome do Beneficiário/CPF/CNPJ/Endereço INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUST CPF/CNPJ: 42.521.088/0001-37 RUA MAYRINK VEIGA 9 24 ANDAR ED WHITE MARTINS , RIO DE JANEIRO - RJ CEP: 20090910		
Agência/Código do Beneficiário 2234-9 / 333028-1		Autenticação Mecânica

 <b>BANCO DO BRASIL</b>	<b>001-9</b>	<b>00190.00009 02940.916196 28709.884176 8 85370000003600</b>			
Local de Pagamento <b>PAGÁVEL EM QUALQUER BANCO ATÉ O VENCIMENTO</b>			Data de Vencimento 20/02/2021		
Nome do Beneficiário/CPF/CNPJ INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUST CPF/CNPJ: 42.521.088/0001-37			Agência/Código do Beneficiário 2234-9 / 333028-1		
Data do Documento 22/01/2021	Nr. Documento 29409161928709884	Espécie DOC DS	Aceite N	Data do Processamento 22/01/2021	Nosso-Número 29409161928709884
Uso do Banco 29409161928709884	Carteira 17	Espécie R\$	Quantidade	xValor	(-) Valor do Documento 36,00
Informações de Responsabilidade do Beneficiário A data de vencimento não prevalece sobre o prazo legal. O pagamento deve ser efetuado antes do protocolo. Órgãos públicos que utilizam o sistema SIAFI devem utilizar o número da GRU n o campo Número de Referência na emissão do pagamento. Processo: 1020200183044 Serviço: 260-Outras petições			(-) Desconto/Abatimento		
			(+/-) Juros/Multa		
			(-) Valor Cobrado		
Nome do Pagador/CPF/CNPJ/Endereço FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ CPF/CNPJ: 33781055000135 AV BRASIL 4365 MANGUINHOS, RIO DE JANEIRO-RJ CEP:21045900			Código de Baixa		
Sacador/Avalista			Autenticação Mecânica - <b>Ficha de Compensação</b>		



ESCLARECIMENTOS NO PEDIDO BR102020018304-4 DE 08/09/2020

REQUERENTE: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

TÍTULO: FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA, PROCESSO DE  
PRODUÇÃO DE UMA FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA,  
MEDICAMENTO, MÉTODO DE TRATAMENTO, E, USO DE UMA  
FORMULAÇÃO FARMACÊUTICA

R A Z Õ E S

A requerente apresenta em anexo Declaração de inclusão da inventora **Luana Carneiro Palma Gonçalves**, bióloga, brasileira, portadora do CPF No.: 016876075-40, residente à Avenida Industrial Urbana, nº 918, Condomínio Verde Ville 2, bloco 16, apto 003, Setor Industrial Urbano, Camaçari, BA, CEP: 42802-570, Brasil, e solicita assim, que a mesma seja incluída no presente pedido.

Rio de Janeiro, 25 de janeiro de 2021

  
p/p Kasznar Lechnardos Propriedade Intelectual

## SUBSTABELECIMENTO

**KASZNAR LEONARDOS DALE BARBOSA COLONNA ROSMAN VIANNA – AGENTES DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL**, Sociedade Simples Pura, também operando sob a denominação **KASZNAR LEONARDOS PROPRIEDADE INTELECTUAL**, com sede nesta Cidade, na Rua Teófilo Otoni, nº 63, 6º andar, inscrita no CNPJ/MF sob o nº 15.305.456/0001-37, matriculada como Agente da Propriedade Industrial (API) sob o nº 2297/12 (“Substabelecedora”), neste ato representada por seu sócio-administrador, **GUSTAVO JOSÉ FERREIRA BARBOSA**, brasileiro, casado, portador da C.I. RG nº 3.414.686, expedida pelo IFP/RJ, inscrito como API sob o nº 253/98 e no CPF/MF sob o nº 628.331.207-10, residente e domiciliado nesta cidade, na Rua Eurico Melo, 35, Barra da Tijuca, e por seu sócio, **FILIFE DA CUNHA LEONARDOS**, brasileiro, Agente da Propriedade Industrial (API), casado, portador da carteira de identidade nº 4396782, expedida pelo IFP/RJ, inscrito no CPF/MF sob o nº 887.191.117-20, inscrito como API sob o nº 441/1998, residente e domiciliado na Cidade e Estado do Rio de Janeiro, à Rua Timóteo da Costa nº 1.033, bloco 2, apto. 1.004, Leblon, por este instrumento substabelece os poderes recebidos mediante procuração constante nos autos, ou que se encontra aqui anexa, em favor dos seguintes Substabelecidos:

Nome	Carteira de Identidade	Expedida por	CPF	API
ADRIANA LOUREIRO JOSÉ	07288465-3	IFP/RJ	008.357.417-45	444/98
ALICE RAYOL RAMOS SANDES	10.094.561-7	IFP/RJ	081.000.137-30	2113/11
ANA LUCIA PEREIRA ROQUE	10.463.786-3	IFP/RJ	020.658.337-00	2119/11
ANDRÉ BASTOS VENTURINI	011.871.386-6	DIC/RJ	055.639.127-60	2120/11
ANDRÉ LUIS DE FARIA	09323362-5	IFP/RJ	011.733.987-32	436/98
ANTONIO CARLOS RAMOS	708255	SSP/MG	204.110.907-63	438/98
CLAUDIO ROBERTO BARBOSA	19219485	SSP/SP	138.453.388-57	1594/01
DENISE LEITE DE OLIVEIRA DALE	04.112.597-2	IFP/RJ	606.592.117-34	440/98
EDSON PAULA DE SOUZA	09.861.055-3	IFP/RJ	018.466.457-86	2148/11
EDUARDO COLONNA ROSMAN	02.762.505-2	IFP/RJ	494.507.437-20	252/98
ELISABETH KASZNAR FEKETE	3.381.313	IFP/RJ	756.284.147-00	1295/98
FABIO DE ARAUJO OTTONI FERREIRA	11.749.313-0	IFP/RJ	081.759.257-10	1813/05
FILIFE DA CUNHA LEONARDOS	04.396.782	IFP/RJ	887.191.117-20	441/98
FLAVIA BENZATTI TREMURA POLLI RODRIGUES	27.583.583-1	SSP/SP	288.352.138-78	2165/11
GABRIEL FRANCISCO LEONARDOS	04.697.909-2	IFP/RJ	002.515.997-60	251/98
GISELA RIBEIRO GLISSMANN	10530143-6	IFP/RJ	069.629.147-92	1975/07
GUSTAVO JOSÉ FERREIRA BARBOSA	3.414.686	IFP/RJ	628.331.207-10	253/98
JOÃO LUIS D'OREY FACCO VIANNA	05.199.476-2	IFP/RJ	606.741.647-68	256/98
LIZ CARNEIRO LEÃO STARLING	04.785.262-9	IFP/RJ	721.634.537-15	254/98
MARCELO CANELLAS LEITE	06.387.929-0	IFP/RJ	776.435.427-91	1369/99
MARIA CLAUDIA SABATINI	10.313.943-2	IFP/RJ	068.489.467-02	2212/11
MAURICIO LEONARDOS	1.233.204	IFP/RJ	008.357.907-97	250/98
MONICA DE CASSIA PEREIRA DA MOTTA	07.039.382-2	IFP/RJ	899.192.897-87	439/98
PATRICIA SCHNEIDER JORGE	10.626.017-7	IFP/RJ	073.938.137-77	1844/05
PRISCILA MAYUMI KASHIWABARA	28.997.419-7	SSP/RJ	284.025.168-07	2237/11
RICARDO CARDOSO COSTA BOCLIN	08050715-5	IFP/RJ	976.131.857-53	1857/05
ROBERTA DE OLIVEIRA MENDES	94014013175	IIICE/CE	618.885.833-04	2246/11
RONALDO MAGALHÃES VARELLA GOMES	4.496.124	IFP/RJ	777.613.677-87	1394/99
SONIS DE MORAES SOUZA	1.590.576	IFP/RJ	097.703.997-87	1374/99
TATIANA ALMEIDA SILVEIRA	09444762-0	IFP/RJ	032.276.897-74	1677/03
THEREZA GONÇALVES CURTI ABRANCHES	08808913-1	IFP/RJ	035.340.537-02	446/98
TOMAZ FRANCISCO LEONARDOS	1.029.718	IFP/RJ	008.359.007-20	249/98
WALTER LUIS	04.870.305-2	IFP/RJ	690.807.807-82	435/98

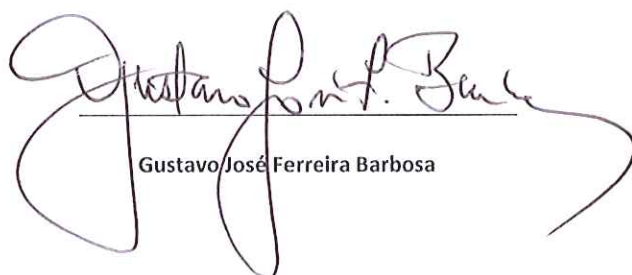
todos brasileiros, com escritório nesta Cidade do Rio de Janeiro, na Rua Teófilo Otoni nº 63, 6º andar, a quem substabelece poderes para serem exercidos **ISOLADAMENTE**, independente da ordem de nomeação, podendo os Substabelecidos representar clientes da Substabelecedora na assinatura de quaisquer documentos, requerimentos, petições, bem como



substabelecer, e, em especial, (i) requerer e obter registros propriedade industrial, tais como os de marcas de indústria, de comércio e de serviços, títulos de estabelecimento, expressões ou sinais de propaganda, indicações geográficas, patentes de privilégio de invenção, modelos de utilidade, certificados de adição e registros de desenhos industriais; (ii) requerer e obter registros de programas de computador e de contratos relativos a programas de computador; (iii) promover perante a autoridade competente a apresentação de provas de uso e o pagamento das anuidades, quinquênios ou quaisquer outras taxas de manutenção, bem como as prorrogações ou renovações cabíveis; (iv) apresentar protestos, oposições, impugnações, pedidos de reconsideração e de nulidade administrativa, recursos, replicas e defesas escritas ou orais para defesa ativa e passiva dos interesses da mandante; (v) requerer e obter buscas e certidões, a anotação de mudanças de nome ou sede, de transferências, de cessões de domínio e de gravame ou penhor, bem com a averbação e o registro de contratos de licença para fabricação ou cessão de uso de quaisquer dos direitos acima mencionados e de contratos de transferência de tecnologia, prestação de serviços de assistência técnica, franquias e assemelhados; (vi) requerer devoluções de taxas ou retribuições, receber e dar quitação relativamente a tais taxas ou retribuições; (vii) desistir e transigir; e (viii) praticar tudo o mais que for necessário ao bom e fiel cumprimento deste mandato. São aqui ratificados os atos eventualmente já praticados pelos Substabelecidos, ficando certo, ainda, que os poderes ora enunciados poderão ser exercidos perante qualquer Repartição Pública ou Autárquica, Federal, Estadual ou Municipal do Brasil, inclusive o Instituto Nacional da Propriedade Industrial – INPI, a Agência Nacional de Vigilância Sanitária – ANVISA, o Conselho Nacional de Combate à Pirataria e Delitos Contra a Propriedade Intelectual – CNCP, e ainda perante o Banco Central do Brasil – BACEN. Para os devidos fins, este substabelecimento é aplicável a todas as procurações já outorgadas no passado, ou que venham a ser futuramente outorgadas à Substabelecidora, cessando automaticamente seus efeitos em relação ao Substabelecido que não mais prestar serviços à Substabelecidora.

Rio de Janeiro, 04 de fevereiro de 2013.

**KASZNAR LEONARDOS PROPRIEDADE INTELECTUAL**



Gustavo José Ferreira Barbosa



Filipe da Cunha Leonardos

189 Ofício de Notas - Tabelião Luis Vitoriano Vieira Teixeira  
 Av. Presidente Vargas, 435 12. andar - RJ - Tel. 2507-6151 - Nº 966159  
 Reconheço por semelhança a(s) firma(s): GUSTAVO JOSE FERREIRA BARBOSA#  
 A-98/19-SLT28556, FILIPE DA CUNHA LEONARDOS-91/6-SLT28557, #=====

Rio de Janeiro, 4 de Fevereiro de 2013 as 15:09:42

2- Em Testemunho da verdade.

FERNANDO RENAN DE QUEIROZ - Autorizado - FRQ - 1407

Firma 0,98 + Dados 3,60 + FETA 0,91 + Fundos 0,62 = R\$12,22



## DECLARAÇÃO

**FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ**, empresa brasileira, com sede à Av. Brasil, 4365, Rio de Janeiro, CEP 21045-900, RJ, Brasil; requerente do pedido de patente depositado no Brasil sob o Protocolo No. BR 10 2020 018304 4 em 08/09/2020; **Patrícia Sampaio Tavares Veras**, brasileira, médica, residente na Rua da Graviola, 468, ap. 701, Caminho das Árvores, Salvador, BA, CEP: 41820-360, Brasil, **Helvécio Vinícius Antunes Rocha**, brasileiro, farmacêutico, residente na Estrada do Bananal, 981, bloco 3, ap 403, Freguesia, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 22750-012, Brasil, **Beatriz Ferreira de Carvalho Patricio**, brasileira, farmacêutica, residente à Rua Mariz e Barros, 821, bloco 2, ap. 505, Maracanã, Rio de Janeiro, RJ, CEP: 20270-004, Brasil, **Fabio Rocha Formiga**, brasileiro, farmacêutico, residente à Av. Dr. Malaquias, 195, ap. 301, Graças, CEP: 52050-060, Recife, PE, Brasil, **Kercia Pinheiro Cruz**, brasileira, bióloga, residente à Rua Armando Souza, 5, 2º andar, Tancredo Neves, CEP: 41.207-010, Salvador, BA, Brasil, **Diana Angélica dos Santos Dantas**, brasileira, biomédica, residente à Av. Dom João VI, 800, torre E, ap.2203, CEP: 40290-000, Brasil, **Marina Faillace de Amorim**, brasileira, bióloga, residente à Av. Princesa Isabel, 211, ap. 502, Barra, CEP: 40130-030, Salvador, BA, Brasil, **Juliana Perrone Bezerra de Menezes Fullam**, brasileira, bióloga, residente à Rua Haeckel José de Almeida, 551, casa 69, Piatã, CEP: 41650-055, Salvador, BA, Brasil, **Cláudia Ida Brodskyn**, brasileira, biomédica, residente à Rua Wanderley de Pinho, 181, ap. 1004, Itaipara, CEP: 41815-270, Salvador, BA, Brasil, **Antonio Luis de Oliveira Almeida Petersen**, brasileiro, biólogo, residente à Rua Ranulfo Oliveira, 445, ap. 203, Jardim Apipema, CEP: 40155-030, Brasil, Salvador, BA, inventores do presente pedido de patente de invenção brasileiro, declaram que reconhecem que **Luana Carneiro Palma**

**Gonçalves**, brasileira, bióloga, residente à Avenida Industrial Urbana, nº 918, Condomínio Verde Ville 2, bloco 16, apto 003, Setor Industrial Urbano, CEP: 42802-570, Camaçari, BA, Brasil contribuiu também para a presente invenção e, conseqüentemente, deverá ser mencionada em relação a este pedido de patente.

Rio de Janeiro, 21 de janeiro de 2021.



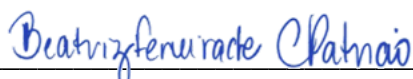
**Marco Aurélio Krieger**



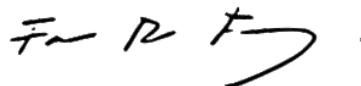
**Patrícia Sampaio Tavares Veras**



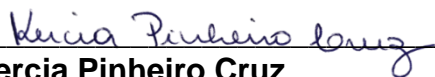
**Helvécio Vinícius Antunes Rocha**



**Beatriz Ferreira de Carvalho**



**Fabio Rocha Formiga**



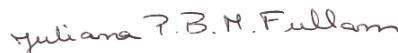
**Kercia Pinheiro Cruz**



**Diana Angélica dos Santos Dantas**



**Marina Faillace de Amorim**



**Juliana P. Bezerra de Menezes Fullam**



**Cláudia Ida Brodskyn**



**Antonio Luis de O. Almeida Petersen**



**Luana Carneiro Palma Gonçalves**

### 9. 3 Colaborações em artigos científicos

#### Colaboração em artigo científico publicado

Antonio Luis de O. A. Petersen, Benjamin Cull, Beatriz R. S. Dias, Luana C. Palma, Yasmin da S. Luz, Juliana P. B. de Menezes, Jeremy C. Mottram and Patrícia S. T. Veras. **17-AAG-Induced Activation of the Autophagic Pathway in *Leishmania* Is Associated with Parasite Death.** *Microorganisms* **2021**, 9, 1089.

#### Colaboração em artigo científico aceito

Amanda R. Paixão, Beatriz R. S. Dias, Luana C. Palma, Natália M. Tavares, Cláudia I. Brodskyn, Juliana P. B de Menezes and Patricia S. T. Veras. **Investigating the Phagocytosis of *Leishmania* using Confocal Microscopy.** *Journal of Visualized Experiments*.



## Article

# 17-AAG-Induced Activation of the Autophagic Pathway in *Leishmania* Is Associated with Parasite Death

Antonio Luis de O. A. Petersen <sup>1</sup>, Benjamin Cull <sup>2</sup> , Beatriz R. S. Dias <sup>1</sup> , Luana C. Palma <sup>1,3</sup>, Yasmin da S. Luz <sup>1</sup>, Juliana P. B. de Menezes <sup>1</sup> , Jeremy C. Mottram <sup>2,4</sup> and Patrícia S. T. Veras <sup>1,5,\*</sup>

- <sup>1</sup> Laboratory of Parasite-Host Interaction and Epidemiology (LAIPHE), Gonçalo Moniz Institute—FIOCRUZ, Salvador 40296-710, Brazil; petersen.swe@gmail.com (A.L.d.O.A.P.); beatrizrsdias@gmail.com (B.R.S.D.); luanabio@hotmail.com (L.C.P.); yasmindasilvaluz.1997@gmail.com (Y.d.S.L.); juliana.fullam@fiocruz.br (J.P.B.d.M.)
- <sup>2</sup> Wellcome Trust Centre for Molecular Parasitology, Institute of Infection, Immunity and Inflammation, College of Medical Veterinary and Life Sciences, University of Glasgow, Glasgow G12 8QQ, UK; bcull53@hotmail.com (B.C.); jeremy.mottram@york.ac.uk (J.C.M.)
- <sup>3</sup> Post-Graduate Program in Experimental Pathology, Federal University of Bahia (UFBA), Salvador 40110-909, Brazil
- <sup>4</sup> Department of Biology, York Biomedical Research Institute, University of York, York YO10 5DD, UK
- <sup>5</sup> National Institute of Tropical Disease (INCT-DT), National Council for Scientific and Technological Development (CNPq), Brasília 71605-001, DF, Brazil
- \* Correspondence: patricia.veras@fiocruz.br; Tel.: +55-(71)-3176-2263



**Citation:** Petersen, A.L.d.O.A.; Cull, B.; Dias, B.R.S.; Palma, L.C.; Luz, Y.d.S.; de Menezes, J.P.B.; Mottram, J.C.; Veras, P.S.T. 17-AAG-Induced Activation of the Autophagic Pathway in *Leishmania* Is Associated with Parasite Death. *Microorganisms* **2021**, *9*, 1089. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9051089>

Academic Editor: Helena Castro

Received: 26 March 2021

Accepted: 23 April 2021

Published: 19 May 2021

**Publisher's Note:** MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

**Abstract:** The heat shock protein 90 (Hsp90) is thought to be an excellent drug target against parasitic diseases. The leishmanicidal effect of an Hsp90 inhibitor, 17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG), was previously demonstrated in both in vitro and in vivo models of cutaneous leishmaniasis. Parasite death was shown to occur in association with severe ultrastructural alterations in *Leishmania*, suggestive of autophagic activation. We hypothesized that 17-AAG treatment results in the abnormal activation of the autophagic pathway, leading to parasite death. To elucidate this process, experiments were performed using transgenic parasites with GFP-ATG8-labelled autophagosomes. Mutant parasites treated with 17-AAG exhibited autophagosomes that did not entrap cargo, such as glycosomes, or fuse with lysosomes. ATG5-knockout ( $\Delta atg5$ ) parasites, which are incapable of forming autophagosomes, demonstrated lower sensitivity to 17-AAG-induced cell death when compared to wild-type (WT) *Leishmania*, further supporting the role of autophagy in 17-AAG-induced cell death. In addition, Hsp90 inhibition resulted in greater accumulation of ubiquitylated proteins in both WT- and  $\Delta atg5$ -treated parasites compared to controls, in the absence of proteasome overload. In conjunction with previously described ultrastructural alterations, herein we present evidence that treatment with 17-AAG causes abnormal activation of the autophagic pathway, resulting in the formation of immature autophagosomes and, consequently, incidental parasite death.

**Keywords:** Hsp90; leishmaniasis; chemotherapy; Hsp90 inhibitors; autophagy; ubiquitin

## 1. Introduction

*Leishmania* spp. are protozoan parasites [1,2] that cause leishmaniasis, which can present in a variety of clinical manifestations, including skin and visceral forms [3]. Being one of the most important neglected tropical diseases, leishmaniasis affects millions of people worldwide. Financial investment in new therapeutic strategies has been scarce [3], resulting in pentavalent antimonials being the drug of choice for more than 70 years in Brazil. However, antimonial therapy requires parenteral administration at high dosage and involves a lengthy therapeutic course that can result in a range of serious side effects [4]. Recent increases in therapeutic failure [5–7] reinforce the importance of developing new drugs capable of replacing or complementing existing strategies for leishmaniasis treatment.

Heat shock protein 90 (Hsp90) has been considered as a potential molecular target for the treatment of parasitic diseases [8–10]. Hsp90 inhibitors, such as geldanamycin or 17-N-allylamino-17-demethoxygeldanamycin (17-AAG), have demonstrated inhibitory effects on the differentiation process of *Leishmania* in vitro [11] and were shown to exert anti-parasitic activity in vitro and in vivo [12–16]. These inhibitors are members of a family of antibiotics that selectively bind to the Hsp90 ATP pocket, preventing ATP hydrolysis and folding of client proteins that do not achieve a tertiary structure. In mammals, these unfolded proteins are eventually degraded in the ubiquitin-proteasome system, which can result in cell death secondary to proteasome overload. This can subsequently lead to the formation of protein aggregates [17–20], resulting in the activation of a protective selective autophagic process in order to avoid aggregate accumulation in the cytoplasm [21–23]. Alternatively, Hsp90 inhibition can lead to a pronounced transcription of Hsp70, Hsp90 and Hsp40, responsible for mounting mis- or unfolded proteins, thereby limiting the formation of polyubiquitylated protein aggregates [24].

In previous studies, we have demonstrated that 17-AAG was capable of controlling *Leishmania* infection (in vitro [15] and in vivo [16]) by eliminating promastigotes, which colonize the insect vector, as well as amastigotes, which are found within vertebrate host cells [15,16]. Nevertheless, the mechanism by which Hsp90 inhibition causes parasite death remains unclear. Electron microscopy revealed ultrastructural alterations suggestive of the activation of autophagy in parasites, including progressive cytoplasmic vacuolization, double-membrane vacuoles, myelin figures and vacuoles containing cytoplasmic material, all occurring in the absence of significant alterations in cellular nuclei, mitochondria or plasma membranes [15].

The conserved autophagic process in eukaryotic cells is responsible for the turnover of long-lived proteins and organelles inside autophagosomes [25,26], which plays an important role in cellular homeostasis and in cell survival in response to different types of stress [25,27–29]. Autophagosomes are formed in successive steps involving the recruitment and activation of proteins of the ATG (AuTophagy-related genes) family [30–32]. In *Leishmania* parasites, ATG12 must firstly conjugate with ATG5 in order for ATG8 to participate in the assembly of this complex, resulting in the formation of autophagosomes [33–35] that may acquire cargo and fuse with lysosomes, thereby forming autolysosomes [33,34]. The engulfed material is degraded, generating small molecules that may be utilized for cell survival [36,37]. Autophagy has also been identified as essential to the differentiation of *Leishmania* promastigotes into amastigotes [33]. By contrast, autophagic induction has been associated with death in eukaryotic cells [30,38]. Thus, the true role played by autophagy with respect to the mechanism responsible for causing protozoan parasite death in response to several stress stimuli, including antiparasitic drugs, remains to be elucidated [39].

We hypothesize that 17-AAG induces abnormal activation of autophagy in *Leishmania* spp., resulting in parasite death. To test this, several genes of the autophagic pathway were genetically modified in *L. major* promastigotes, which were used to investigate the participation of autophagy in parasite death following treatment with 17-AAG.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. *Leishmania* Culturing

*Leishmania major* (MHOM/JL/80/Friedlin) were cultivated in modified HOMEM medium (Gibco, Carlsbad, CA, USA) supplemented with 10% (*v/v*) heat-inactivated fetal calf serum (Gibco) and 1% (*v/v*) penicillin streptomycin solution (Sigma, St. Louis, MO, USA) at 25 °C until mid-log phase was achieved, corresponding to  $5 \times 10^6$  parasites/mL.

### 2.2. Generation of Parasite Mutants Expressing Fluorescent Markers

All mutant parasites used in this research were previously generated by our collaborators and are described as follows: (i) green fluorescent protein-ATG8 (GFP-ATG8) plasmid as described by Besteiro et al. [33]; (ii) the glycosome targeting SQL motif labelled with RFP plasmid (RFP-SQL) as described by Cull et al. [40]; (iii) the proCPB lysosomal-marker

labeled with RFP plasmid (RFP-proCPB) by Huete-Perez et al. [41]. Null mutant *atg5* parasites ( $\Delta atg5$ ),  $\Delta atg5$  expressing GFP-ATG8 ( $\Delta atg5$ (GFP-ATG8)) and  $\Delta atg5::ATG5$  parasites re-expressing ATG5 in the  $\Delta atg5$  null mutant were generated by Williams et al. [35] and used as controls. In sum, two plasmids, both derived from pGL345-HYG, the pGL345ATG5-HYG5' 3' and pGL345ATG5-BLE5' 3', were generated with fragments of the 5' and 3' UTRs flanking the ORF of ATG5 gene. The resulting linearized cassettes were used in two rounds of electroporation using a nucleofector transfection system according to the manufacturer's instructions (Lonza, Basel, Switzerland) to produce a heterozygous cell line, simultaneously resistant to hygromycin and bleomycin. To select the parasites that successfully expressed the desired proteins, an appropriate antibiotic was used to treat each transfected parasite line: G418 (Neomycin) at 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Hygromycin at 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Blastidicin S at 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ; Phleomycin at 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  (all from InvivoGen, San Diego, CA, USA).

### 2.3. Parasite Treatment with 17-AAG or Pentamidine

In accordance with each experimental protocol, promastigotes of *L. major* were submitted to treatment procedures using the antileishmanial 17-AAG (InvivoGen, San Diego, CA, USA) (100, 300 or 500 nM) or pentamidine (Sigma, St. Louis, MO, USA) (10, 20 and 30  $\mu\text{M}$ ) for up to 72 h. At the end of each treatment period, parasites were pelleted by centrifugation for 3 min at  $1000 \times g$  and then washed thrice in PBS for medium removal. Cells were then resuspended in PBS and a 10  $\mu\text{L}$  suspension was spread thinly over a slide covered with a  $22 \times 40$  mm coverslip, then sealed with nail varnish to perform fluorescence microscopy.

### 2.4. Assessment of Autophagosome Formation and Autophagosome Colocalization with Glycosomes and Lysosomes by Fluorescence Microscopy

Fluorescence microscopy was used: (i) to assess the presence of GFP-ATG8-labelled vesicles, characteristic of autophagosomes, which appear as punctate structures as previously described [40,42] and (ii) to evaluate the effects of 17-AAG treatment on the autophagosomal maturation process using the two *L. major* double-mutant promastigotes: GFP-ATG8 and RFP-SQL; GFP-ATG8 and proCPB-RFP. To quantify the number of GFP-ATG8-labelled vesicles and determine the percentage of parasites containing GFP-ATG8-labelled vesicles, after mounting for up to 1 h, parasite smears were observed under a DeltaVision Core deconvolution microscope (Applied Precision Inc., Issaquah, WA, USA) using GFP or mCherry filters at 1,000 magnification. For cell visualization, DIC images were also obtained under polarized light. All images were processed and analyzed using SoftWoRx image analysis software (Applied Precision Inc.) [40,42]. At least 300 parasites were counted for each combination of treatment and time point, with no less than three independent experiments considered. Also, the effects of 17-AAG treatment on the autophagosomal maturation process was evaluated in the double-mutant *L. major* promastigotes. Autophagosome colocalization with glycosomal cargo or with lysosomes was evaluated after treatment with 500 nM of 17-AAG at 24 or 48 h. Parasites were also imaged using a DeltaVision Core deconvolution microscope as described above. Images were submitted to colocalization analysis using SoftWoRx image analysis as previously described [43].

### 2.5. Parasite Viability

Axenic parasites in mid-log phase were treated with serial dilutions of 17-AAG for 48 h at concentrations ranging from 10 to 15,625 nM or with DMSO (control), and after adding AlamarBlue (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) (10% final concentration) followed by incubation for another 24 h at 24 °C, reagent absorbance was measured at the wavelengths of 570 and 600 nm.

To evaluate the kinetics of 17-AAG on the viability of  $\Delta atg5$  compared to WT and  $\Delta atg5::ATG5$  parasites, promastigote cultures were treated with 300 nM and 500 nM of the Hsp90 inhibitor for 24 h, 48 h and 72 h at 24 °C. AlamarBlue was added and absorbance was measured as described above. Treatment effect was estimated by determining the area under the curve (AUC) for each group.

## 2.6. Parasite Growth Curve

*Leishmania* cell lines (WT,  $\Delta atg5$  and  $\Delta atg5::ATG5$ ) at a concentration of  $10^5$  cells/mL were incubated in 10 mL of HOMEM medium supplemented with 10% (*v/v*) heat-inactivated fetal calf serum and 1% (*v/v*) penicillin streptomycin solution. Cells were treated or not with 100 nM of 17-AAG and counts were performed daily for at least 13 days. Parasite numbers were recorded and plotted.

## 2.7. Western Blot to Assess Ubiquitylated Proteins

The accumulation of ubiquitylated proteins in parasites treated with 17-AAG (500 nM) for 24 h was evaluated by Western blot analysis. As a positive control, parasites were treated with the proteasome inhibitor MG132 (3  $\mu$ M) for 24 h. Following treatment, parasites were pelleted by centrifugation for 3 min at  $1000\times g$ , and then washed thrice in PBS for medium removal. Protein extraction was then performed for Western blot analysis as described below.

Parasites were lysed with laemmli buffer (2-Mercaptoethanol 0.1%, bromophenol blue 0.0005%, glycerol 10%, SDS 2%, Tris-HCl 63 mM, pH 6.8) at a proportion of 10  $\mu$ L of buffer for  $10^6$  parasites, then boiled for 5 min and cell extracts were stored at  $-20^\circ\text{C}$ . Proteins were transferred from a 12% polyacrylamide gel, following electrophoresis, to a Hybond-C nitrocellulose membrane (Amersham, GE Healthcare, Little Chalfont, UK). Transfer was carried out by semi-dry blotting using a BioRad Trans-Blot SD Semi-Dry Transfer Cell at 30 volts for 45 min, with membranes and filter papers soaked in transfer buffer (20 mM Tris-HCl, 15 mM glycine, 20% (*v/v*) methanol, in distilled water). Membranes were subsequently incubated in a blocking solution for 1 h at room temperature or overnight at  $4^\circ\text{C}$  under agitation. After blocking, each membrane was incubated with 1:1000 FK2 anti-ubiquitin antibody (LifeSensors, Malvern, PA, USA) diluted in fresh TBST buffer with 3% milk for 1 h at room temperature. Secondary anti-mouse antibody conjugated with horseradish peroxidase (HRP) (Promega, Madison, WI, USA) was diluted at 1:10,000 in fresh TBST buffer and each membrane was first incubated with an ECL (Enhanced Chemiluminescence) solution (SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate Kit, Pierce, Rockford, IL, USA), and then exposed on Kodak photographic film. An antibody against elongation factor  $1\alpha$  (EF1 $\alpha$ ) (Millipore, Germany) was used for loading control. Western blotting experiments were performed three times.

## 2.8. Assessment of Protein Aggregation

Axenic promastigotes of *L. major* lines (WT,  $\Delta atg5$  and  $\Delta atg5::ATG5$ ) were treated with 17-AAG (500 nM) or MG132 (3  $\mu$ M) for 24 h at  $24^\circ\text{C}$ . The aggregation of soluble proteins was analyzed following a previously described protocol [44] employing SDS-PAGE. Briefly,  $3 \times 10^8$  parasites were centrifuged at  $1800\times g$  at  $4^\circ\text{C}$  for 10 min. The pellet was resuspended in 500  $\mu$ L of lysis buffer (50 mM potassium phosphate buffer, 1 mM EDTA, 5% glycerol, 1 mM protease inhibitor, Roche, Mannheim, Germany) and submitted to a 5 freeze-thaw cycles (liquid nitrogen-water). Intact cells were removed by centrifugation at  $1800\times g$  for 5 min and proteins were quantified. Then, 1 mg of protein from each group was centrifuged at  $15,000\times g$  for 20 min to isolate the membrane and aggregate fractions. Next, pellets were resuspended in lysis buffer, then sonicated and membrane proteins were removed via the addition of 2% NP40 followed by centrifugation at  $15,000\times g$  for 20 min. Pellets were resuspended in 100  $\mu$ L of SDS sample buffer and heated at  $95^\circ\text{C}$  for 5 min. Samples were then analyzed using 10% SDS-PAGE, followed by silver labeling using a Bio-Rad Silver Stain kit (Bio-Rad, Hercules, CA, USA) in accordance with the manufacturer's instructions. Experiments were independently repeated three times.

## 2.9. Statistical Analysis

The half maximal inhibitory concentration ( $IC_{50}$ ) of 17-AAG in *L. major* WT,  $\Delta atg5$  and  $\Delta atg5::ATG5$  promastigotes was determined by performing sigmoidal regression on each respective concentration-response curve. Data are presented as the mean  $\pm$



standard deviation of the mean under parametric analysis (One-way ANOVA or Welch's ANOVA test followed by Tukey's or Dunnett's Multiple Comparisons) or medians and quartile ranges in the case of non-parametric analysis (Kruskal-Wallis test, Dunn's multiple comparison). All data were analyzed using the Prism program (GraphPad software, V. 9.1.0 La Jolla, CA, USA).

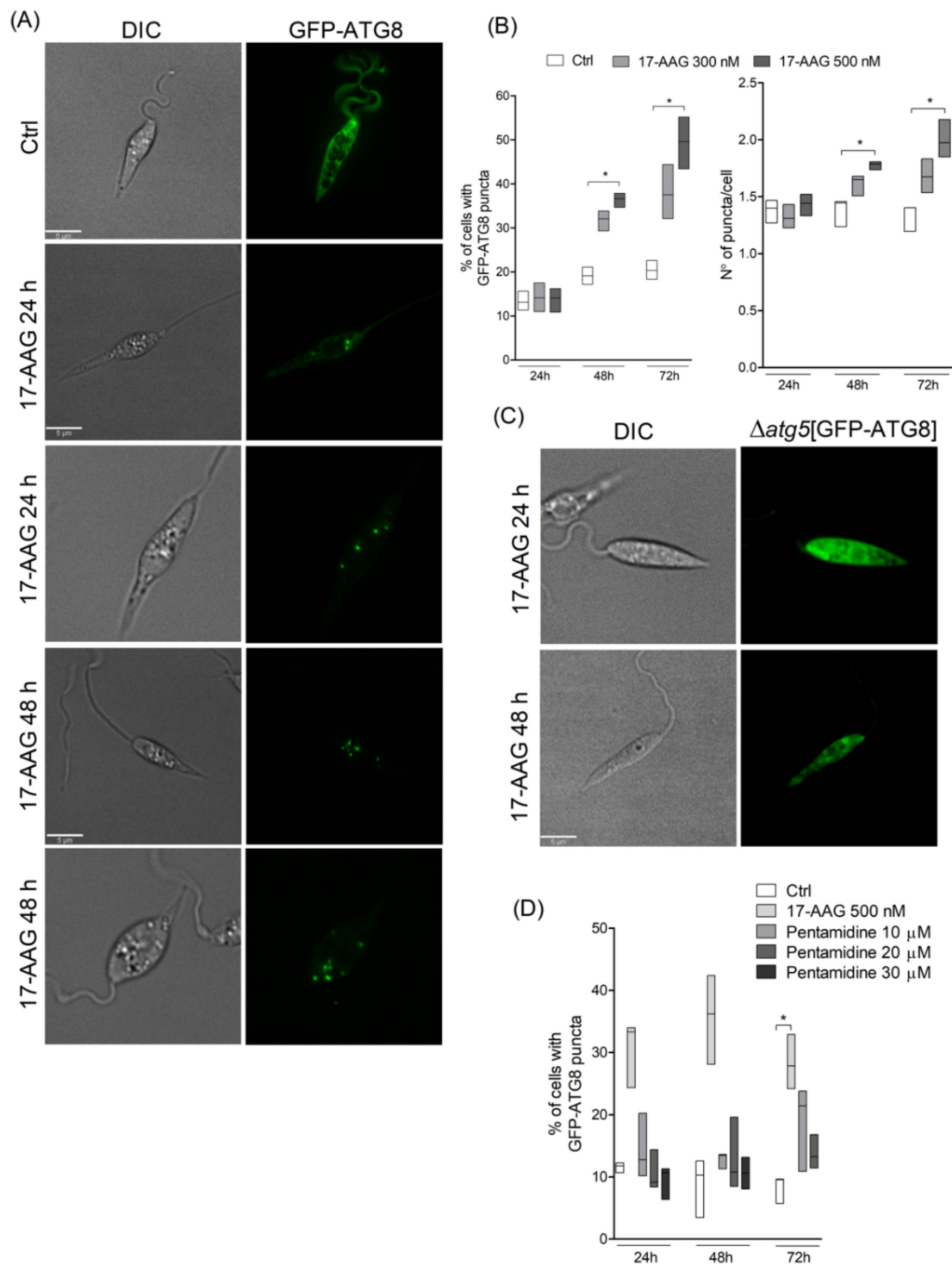
### 3. Results

#### 3.1. 17-AAG Induces Autophagosome Formation in Promastigote Forms of *Leishmania*

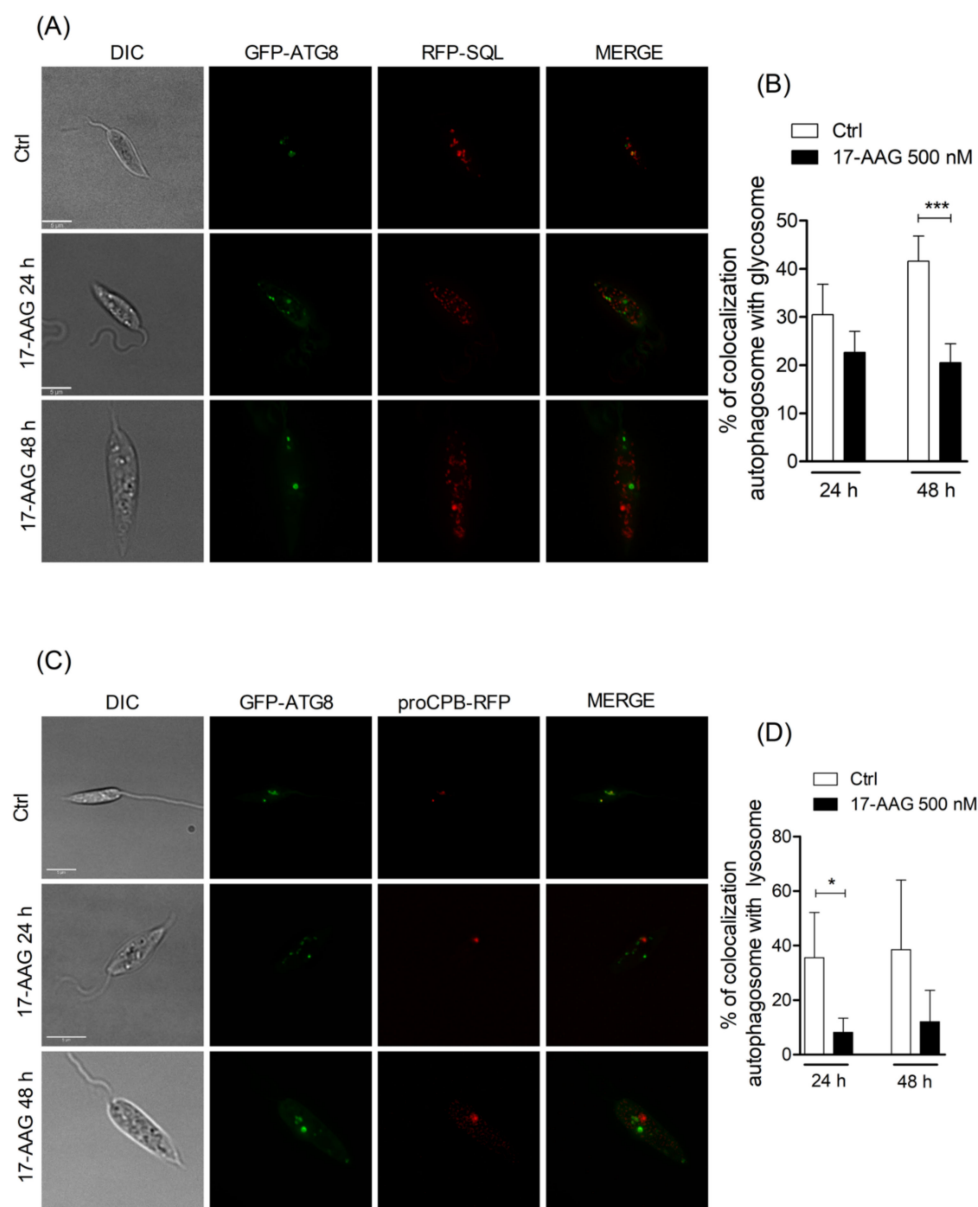
Treatment of *Leishmania* parasites with 17-AAG at the concentration of 500 nM resulted in an increased number of parasites containing green-labeled punctate structures (Figure 1A). After 48 h of treatment at both 300 and 500 nM, among counted parasites, 33.1% (Q1: 29.3; Q3: 33.9) and 37.4% (Q1: 34.7; Q3: 37.8,  $p < 0.05$ ), respectively, of parasites contained punctate structures, while these alterations were seen in only 19.2% (Q1: 17.2; Q3: 21.1) of control parasites (Figure 1B;  $p < 0.05$ ). This percentage of *L. major* promastigotes containing punctate structures increased after 72 h of treatment, with a median value of 36.1% (Q1: 32.1; Q3: 44.4) of the parasites treated with 300 nM and 50.2% (Q1: 43.5; Q3: 55.2,  $p < 0.05$ ) of those treated with 500 nM revealing labeled vesicles in the cytosol, while the level of control parasites containing punctate structures was 20.1% (Q1: 18.3; Q3: 22.6) at 72 h of treatment (Figure 1B). The median values of the number of punctate structures in parasites treated with 300 nM of 17-AAG at 48 and 72 h were not statistically different compared to diluent-treated *L. major* promastigotes. The median number of GFP-ATG8-labeled vesicles per parasite after 48 and 72 h was higher in parasites treated with 500 nM of 17-AAG, with values of 1.8 (Q1: 1.7; Q3: 1.8,  $p < 0.05$ ) and 2.0 (Q1: 1.8; Q3: 2.2), respectively, compared to median values of 1.4 (Q1: 1.2; Q3: 1.5,  $p < 0.05$ ) and 1.2 (Q1: 1.2; Q3: 1.4) (Figure 1B) in control parasites. The atg5-deficient parasites expressing GFP-ATG8 ( $\Delta atg5$ (GFP-ATG8)) treated with 17-AAG exhibited no fluorescent punctate structures, confirming that the vesicles detected in GFP-ATG8 parasites were indeed autophagosomes (Figure 1C). As an additional control, parasites were treated with another antileishmanial, pentamidine, at concentrations of 10, 20 or 30  $\mu$ M for 24, 48 and 72 h. Treatment with pentamidine caused cell death (data not shown), yet few punctate structures were detected in the cytosol of treated parasites (Figure 1D). This indicates that parasite death is not always associated with autophagosome formation in *Leishmania* parasites.

#### 3.2. 17-AAG Inhibits the Autophagosome Maturation Process

Since the inhibition of endosome and autophagosome fusion with lysosomes by chloroquine has been previously shown to be involved in parasite death [45–47], we investigated whether treatment with 17-AAG was capable of altering the autophagosomal maturation process. In double-mutant parasites expressing GFP-ATG8 and the glycosomal marker, RFP-SQL, a mean value of  $22.7\% \pm 4.4$  of the total number of counted autophagosomes colocalized with glycosomes in parasites treated with 17-AAG (500 nM, 24 h), similar to untreated double-mutant parasites ( $30.5\% \pm 6.4$ ) (Figure 2A,B). After 48 h of treatment, a comparable proportion of colocalization was observed in labeled compartments ( $20.5\% \pm 3.9$ ) in treated parasites, which was significantly lower than that detected in control parasites treated with DMSO,  $41.6\% \pm 5.2$  (Figure 2A,B;  $p = 0.0006$ ). Additionally, double-mutant parasites expressing both GFP-ATG8 and the lysosomal marker, proCPB-RFP, when treated with 17-AAG (500 nM) for 24 and 48 h, exhibited a remarkably lower proportion of autophagosome-lysosome colocalization after 24 h, with mean values of  $8.2\% \pm 5.1$  ( $p = 0.0197$ ) and 48 h,  $12.1\% \pm 11.6$ , in comparison to DMSO-treated controls:  $35.6\% \pm 16.6$  and  $38.6\% \pm 25.6$ , respectively (Figure 2C,D). These findings indicate that 17-AAG treatment resulted in inhibition of the autophagosome maturation process via fusion inhibition of ATG8-labelled vesicles with compartments labelled with lysosomal and glycosomal markers.



**Figure 1.** Evaluation of autophagosome formation in *Leishmania* promastigotes following treatment with 17-AAG. **(A)** Axenic promastigotes of *Leishmania* expressing GFP-ATG8 were treated or not with 17-AAG (500 nM) for 24 or 48 h and imaged by fluorescence microscopy. **(B)** The percentage of cells bearing autophagosomes and the number of autophagosomes per cell were calculated at 24, 48 and 72 h after treatment with 17-AAG (300 or 500 nM). **(C)**  $\Delta atg5$ [GFP-ATG8] parasites were treated with 17-AAG and imaged by fluorescence microscopy. **(D)** Comparison of the percentage of cells bearing autophagosomes after treatment with pentamidine (10, 20 or 30  $\mu$ M) or 17-AAG (500 nM) for 24 and 48 h. Lines within the floating bars represent medians and floating bar quartiles (Q: 25% and 75%) from one out of three independent experiments (Kruskal-Wallis test, Dunn’s multiple comparison test, \*  $p < 0.05$ ).

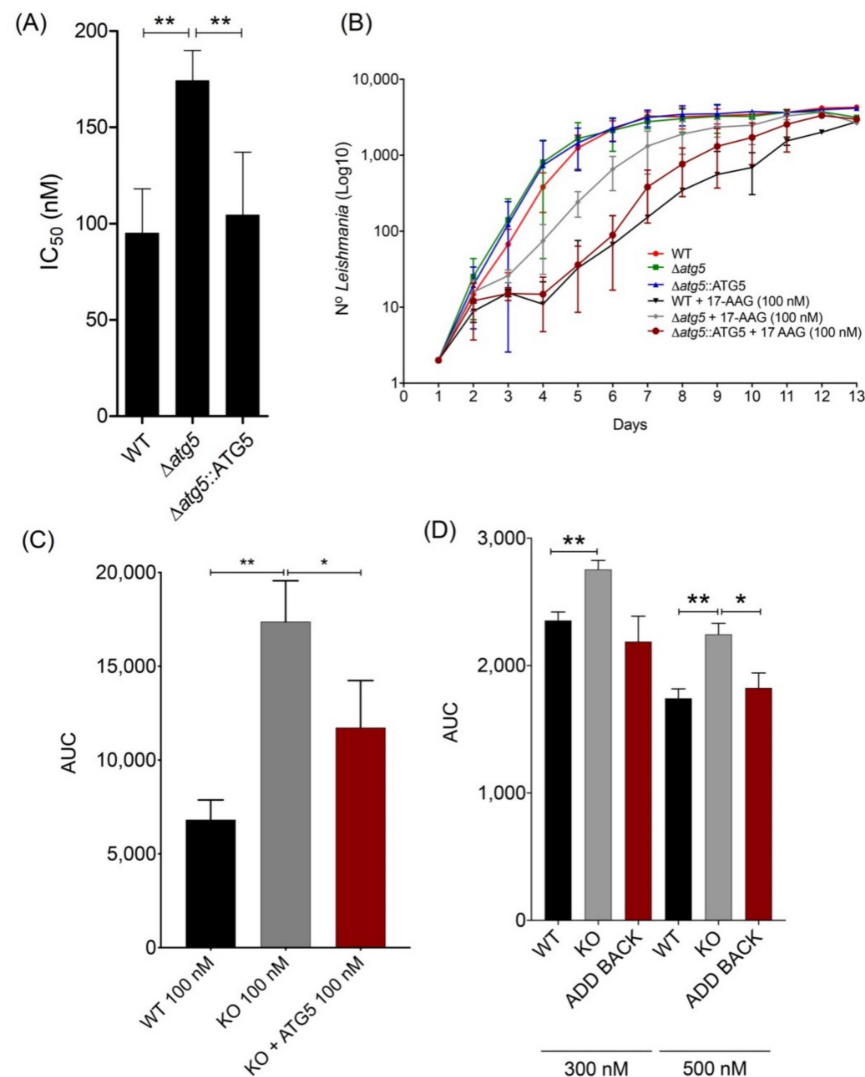


**Figure 2.** Analysis of fusion between autophagosomes and glycosomes or lysosomes. **(A)** Axenic promastigotes of *Leishmania* expressing GFP-ATG8 and RFP-SQL were treated or not with 17-AAG (500 nM) and imaged by fluorescence microscopy. **(B)** Quantification of autophagosome-glycosome colocalization after treatment of *Leishmania* with 17-AAG. **(C)** Axenic promastigotes of *Leishmania* expressing ATG8-GFP and proCPB-RFP were treated or not with 17-AAG (500 nM) and imaged by fluorescence microscopy. **(D)** Quantification of *Leishmania* autophagosome-lysosome colocalization after treatment with 17-AAG. Bars represent medians  $\pm$  SD from one out of three independent experiments (Unpaired t test, \*\*\*  $p = 0.0006$ , \*  $p = 0.0197$ ).

### 3.3. *atg5*-Deficient Parasites Are More Resistant to 17-AAG-Induced Cell Death Than WT Parasites

To evaluate whether autophagy plays a role in 17-AAG-induced parasite death,  $IC_{50}$  values were determined for  $\Delta atg5$  parasites treated with 17-AAG for 48 h, which showed a mean value of  $174.3 \text{ nM} \pm 15.7$ , 83.7% higher than that determined for WT (Figure 3A,  $p < 0.01$ ). Moreover, when the *atg5* gene was added back to the  $\Delta atg5$  parasites ( $\Delta atg5::ATG5$ ), the resulting  $IC_{50}$  value was  $104.3 \text{ nM} \pm 32.9$ , similar to that found in WT *L. major* promastigotes ( $95.0 \text{ nM} \pm 23.1$ ) (Figure 3A,  $p < 0.01$ ). In addition, when cultivated in medium containing 100 nM of 17-AAG for 13 days,  $\Delta atg5$  parasites grew faster than either WT or  $\Delta atg5::ATG5$ , as assessed by growth curves (Figure 3B) and the area under

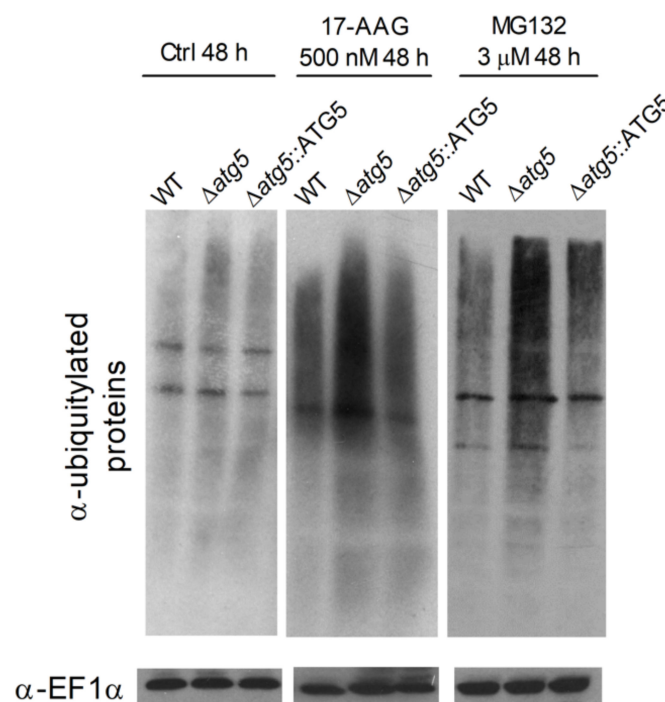
the curve (AUC) (Figure 3C). This marked growth was especially noticeable during the log growth phase (days 5–6) when 500% more  $\Delta atg5$  parasites were seen compared to WT or  $\Delta atg5::ATG5$  (Figure 3B). In contrast, no differences in parasite growth rates were observed among these three parasite lines when cultivated in 17-AAG-free medium (Figure 3B). Even when the highest concentrations of 17-AAG (300 and 500 nM) were administered to promastigotes for up to 72 h, less toxicity was evidenced in the  $\Delta atg5$  lineage compared to WT or  $\Delta atg5::ATG5$  *L. major* parasites (Figure 3D). These findings provide evidence that  $\Delta atg5$  parasites are less susceptible to cell death following treatment with 17-AAG, which suggests the participation of autophagy in inhibitor-induced parasite death.



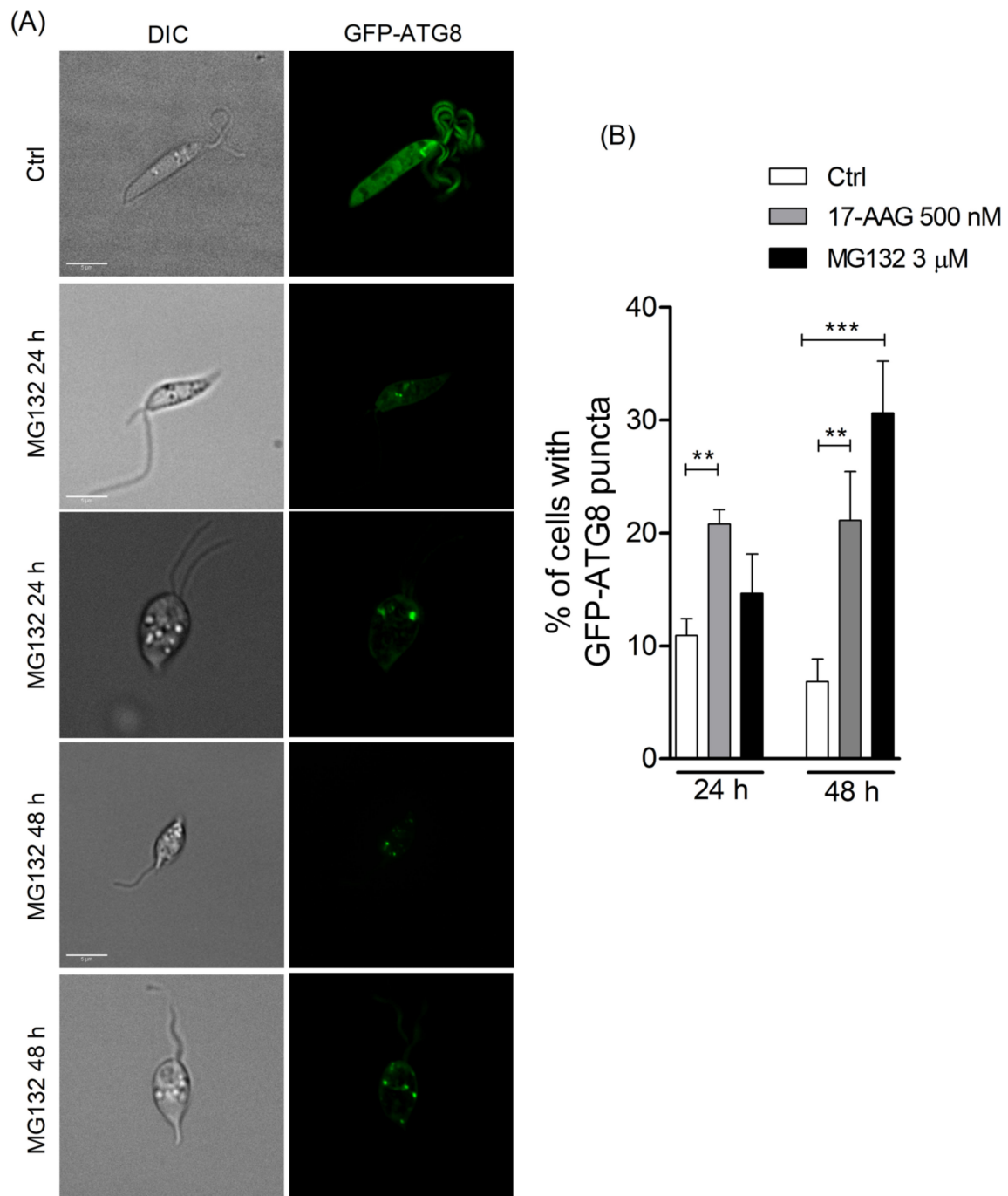
**Figure 3.** Effect of 17-AAG on survival and replication of WT,  $\Delta atg5$  and  $\Delta atg5::ATG5$  *Leishmania*. (A) IC<sub>50</sub> values for 17-AAG in different *Leishmania* lineages. Bars represent mean  $\pm$  SD from four independent experiments (One-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test, \*\*  $p < 0.01$ ). (B) Growth curve reflecting 13 day-counts of WT,  $\Delta atg5$  and  $\Delta atg5::ATG5$  parasites, treated or not with 17-AAG at 100 nM. Symbols are representative of means  $\pm$  SD from three independent experiments. (C) Area under the curve (AUC) analysis of WT,  $\Delta atg5$  and  $\Delta atg5::ATG5$  growth depicted in panel (B), following treatment with 17-AAG. Bars represent mean  $\pm$  SD from three independent experiments (one-way ANOVA test, Tukey's multiple comparison test \*  $p = 0.0321$  0.05, \*\*  $p = 0.0016$ ). (D) AUC analysis of WT,  $\Delta atg5$  and  $\Delta atg5::ATG5$  viability following treatment with 17-AAG at 300 nM and 500 nM for 24 h, 48 h and 72 h. Bars represent mean  $\pm$  SD of a single experiment performed in quadruplicate (Welch's ANOVA test, Dunnett's T3 multiple comparison test \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ ).

### 3.4. 17-AAG Treatment Results in Increased Accumulation of Ubiquitylated Proteins, but Not Protein Aggregates, in *L. major* Parasites

Due to the participation of autophagy in *Leishmania* death arising from 17-AAG treatment, we hypothesized that autophagic activation could be consequent to Hsp90 inhibition, which causes a subsequent enhancement in the amount of ubiquitylated protein. Low basal levels of ubiquitylated proteins were seen in all untreated WT,  $\Delta atg5$  and  $\Delta atg5::ATG5$  parasites (Figure 4). Treatment with 17-AAG (500 nM for 48 h) induced an overall increase in the amounts of ubiquitin-labeled proteins in WT,  $\Delta atg5$  and  $\Delta atg5::ATG5$  parasites (Figure 4). A similar result was observed after 48 h of 17-AAG treatment (data not shown). As expected, of the three lines evaluated,  $\Delta atg5$  parasites demonstrated the greatest accumulation of ubiquitylated proteins after treatment with either 500 nM of 17-AAG or 3  $\mu$ M of MG132 (Figure 4). Predictably, the treatment of parasites with MG132 (3  $\mu$ M, 48 h) increased the accumulation of ubiquitylated proteins in all three parasite lines evaluated. Moreover, treatment with MG132 also resulted in a higher proportion of autophagosomes in GFP-ATG8 parasites, as evidenced by the mean percentage of parasites bearing punctate structures:  $14.7\% \pm 3.5$  in parasites treated for 24 h with 3  $\mu$ M of MG132, in comparison to a mean value of  $10.9\% \pm 1.5$  in control parasites (Figure 5A,B). This difference increased at 48 h to  $30.6\% \pm 4.6$  of parasites treated with 3  $\mu$ M of MG132 compared to  $6.8\% \pm 2.0$  in controls (Figure 5B,  $p = 0.0007$ ). As was also expected, positive controls treated with 500 nM of 17-AAG exhibited a significant increase in the percentage of parasites containing labeled vesicles:  $20.8\% \pm 1.3$  ( $p = 0.0035$ ) at 24 h and  $21.1\% \pm 4.3$  at 48 h ( $p = 0.0091$ ) (Figure 5B). Increased ubiquitylated protein accumulation can result in proteasomal overload and the accumulation of protein aggregates or, alternatively, enhancement in the transcription of Hsp70, Hsp90 and Hsp40 [48].

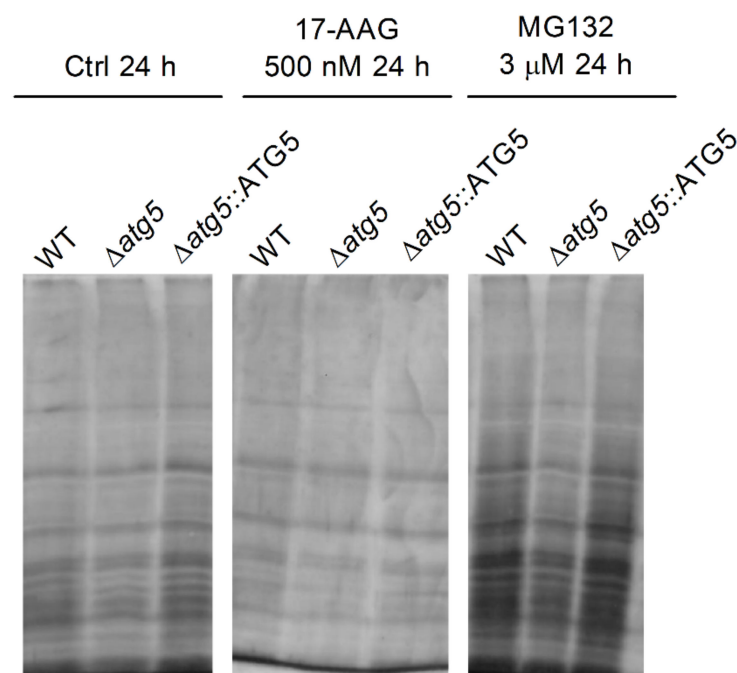


**Figure 4.** Ubiquitylated protein profiles of WT,  $\Delta atg5$  and  $\Delta atg5::ATG5$  after 17-AAG or MG132 treatment. WT,  $\Delta atg5$  and  $\Delta atg5::ATG5$  parasites were treated with 17-AAG (500 nM) or MG132 (3  $\mu$ M) for 48 h. Protein extracts were electrophoresed on a 12% gel, blotted and probed with an FK2 anti-ubiquitin antibody. EF1 $\alpha$  was used as loading control.



**Figure 5.** Evaluation of autophagosome formation in promastigotes of *Leishmania* following treatment with MG132. (A) Promastigotes of *Leishmania* expressing GFP-ATG8 were treated or not with MG132 (3 μM) and imaged by fluorescence microscopy. (B) The percentage of cells bearing autophagosomes was calculated after treatment with 17-AAG (500 nM) or MG132 (3 μM) for 24 and 48 h. Bars represent mean ± SD of three independent experiments (One-way ANOVA, Tukey's multiple comparisons test, \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ ).

Using SDS-PAGE, protein extracts of all parasite strains: WT,  $\Delta atg5$  and  $\Delta atg5::ATG5$  treated with 17-AAG (500 nM for 24 h) did not result in increased protein aggregate formation in comparison to untreated parasites, while positive control parasites treated with MG132 (3 μM for 24 h) revealed increased amounts of protein aggregates (Figure 6).



**Figure 6.** Effect of 17-AAG treatment on WT,  $\Delta atg5$  and  $\Delta atg5::ATG5$  protein aggregate formation. Culture aliquots from WT,  $\Delta atg5$  and  $\Delta atg5::ATG5$  parasites treated with 17-AAG (500 nM) or MG132 (3  $\mu$ M) for 24 h were withdrawn and analyzed to determine quantities of insoluble protein aggregates by cell lysis and centrifugation. Protein aggregates were subjected to SDS-PAGE followed by silver staining. One experiment is representative of two independent experiments.

#### 4. Discussion

The present study confirmed that in *Leishmania* treated with 17-AAG, autophagy is induced by an increased percentage of autophagosomes expressing GFP-ATG8, as well as higher overall numbers of labeled autophagosomes per parasite. We also found that the macroautophagy-deficient  $\Delta atg5$ [GFP-ATG8] *Leishmania*, which is unable to form autophagosomes, did not form any detectable punctate structures.

The present study also found that treatment with 17-AAG induced a reduction in the degree of colocalization between autophagosomes and glycosomes, as well as between autophagosomes and lysosomes, in comparison to controls. Hsp90 is known to control the expression of hundreds of proteins involved in diverse cell functions [49,50]. A previous report described the involvement of Hsp90 in controlling vesicle trafficking and fusion by folding proteins, responsible for recycling RAB proteins from vesicle membranes back into the cytoplasm [51] and vesicle transport proteins that play a role in the transport of glycoproteins from the Golgi to other compartments [52]. Since reduced colocalization of the proCPB-RFP and GFP-ATG8 was observed in *Leishmania* following treatment with 17-AAG compared to untreated parasites, we speculate that Hsp90 inhibition results in the unfolding or incorrect folding of parasite proteins involved in vesicle trafficking and fusion. The inhibition of the fusion of newly-formed autophagosomes with lysosomes could result in the trapping of proteins and organelles within autophagosomes, leading to parasite death. In agreement with our findings, a recent study described that disrupting a cysteine protease located in the vacuolar compartment (VAC) of *Toxoplasma gondii* caused a reduction in the proteolytic activity of parasite lysosomes, the accumulation of undigested autophagosomes in parasite cytoplasm, and subsequently, a reduction in the intensity of infection [53].

We found that survival in  $\Delta atg5$  *L. major* promastigotes increased compared to WT parasites under treatment with 17-AAG. Indeed, we showed that  $\Delta atg5$  *L. major* were not only able to survive and proliferate more efficiently than WT at a low dosage of 17-AAG (100 nM) for 13 days, but were also found to be more resistant to death at higher dosages

(300 and 500 nM). These findings lead us to propose that the activation of the autophagic pathway contributes to *Leishmania* cell death. Macroautophagy is a successful adaptive strategy that functions as a protective mechanism activated under different physiological stress stimuli [54–56]. Similarly to our study, it has been shown that autophagy is induced in *T. gondii* in response to endoplasmic reticulum stress, followed by the accumulation of unfolded proteins [57]. Also, incomplete autophagosome maturation was shown to be harmful to eukaryotic cells [58], including mammals [48,59] and *T. gondii* [53]. Moreover, it was previously demonstrated that several *Leishmania* lines present an inability to complete the transformation process from promastigotes to amastigotes, including *Δatg5* parasites [35], *Δatg4.2* parasites expressing a mutant vesicular sorting protein 4 [33] form autophagosomes that do not fuse with lysosomes, and *Δcpa/cpb* parasites, which do form autophagosomes that fuse with lysosomes, produce non-degraded lysosomal content due to the deficiency of CPA and CPB enzymes [42,60]. This inability to complete transformation leads to a reduced survival rates inside macrophages in vitro [33,35,42,60] and in vivo [35].

The inhibition of Hsp90 in cancer cells results in an increase in the accumulation of ubiquitylated proteins in the cytosol [19], and subsequently, proteasome overload, leading to both the accumulation of unfolded and misfolded proteins [23,61] and protein aggregate formation [62–64]. We speculate that a similar event could take place in parasites treated with 17-AAG. The accumulation of polyubiquitylated proteins following treatment with Hsp90 inhibitors in animal models of neurodegenerative disease [17,24,65] inhibited protein aggregate formation from the activation of Hsp70 and Hsp40 [48,66]. The present study showed that treating *Leishmania* parasites with 17-AAG led to the accumulation of ubiquitylated proteins at levels similar to those observed in parasites treated with the proteasome inhibitor, MG132. Although 17-AAG treatment induced the accumulation of polyubiquitylated proteins, Hsp90 inhibition most likely did not result in proteasome overload, as no enhancement in the formation of protein aggregates was detected (Figure 6), likely due to the activation of other Hsps [66].

In sum, our findings evidence that *Leishmania* cell death caused by 17-AAG is associated with abnormal activation of the autophagic pathway, resulting in the formation of autophagosomes unable to achieve complete autophagolysosomal maturation and therefore incapable of degrading engulfed material.

**Author Contributions:** A.L.d.O.A.P., J.C.M. and P.S.T.V. conceived and designed the experiments; A.L.d.O.A.P., B.C., B.R.S.D., L.C.P., Y.d.S.L. and J.P.B.d.M. performed the experiments; A.L.d.O.A.P., B.C., B.R.S.D., L.C.P., J.P.B.d.M., J.C.M. and P.S.T.V. analyzed the data; P.S.T.V. and J.C.M. contributed reagents/materials/analysis tools; A.L.d.O.A.P. and P.S.T.V. wrote the manuscript. All authors contributed to manuscript elaboration and revision and approved the final version prior to submission. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This research was funded by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior—Brasil (CAPES)—Finance Code 001. This work was also supported by grants from Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado da Bahia (P.S.T.V. <http://www.fapesb.ba.gov.br>, (accessed on 30 August 2013) and CNPq (P.S.T.V.—Universal 422867/2016-0 <http://www.cnpq.br>, (accessed on 30 August 2016) and the Medical Research Council (MR/K019384/1). P.S.T.V. holds a grant from CNPq for productivity in research (307832/2015-5). B.C. was supported by a Medical Research Council studentship.

**Institutional Review Board Statement:** Not applicable.

**Informed Consent Statement:** Not applicable.

**Data Availability Statement:** Not applicable.

**Acknowledgments:** The authors would like to thank Andris K. Walter for English language revision and manuscript copyediting assistance.



**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest. The funders had no role in the design of the study; in the collection, analyses, or interpretation of data; in the writing of the manuscript, or in the decision to publish the results.

## References

1. Herwaldt, B.L. Leishmaniasis. *Lancet* **1999**, *354*, 1191–1199. [[CrossRef](#)]
2. Banuls, A.L.; Hide, M.; Prugnolle, F. Leishmania and the leishmaniasis: A parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv. Parasitol.* **2007**, *64*, 1–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. World Health Organization. Control of the Leishmaniasis. *World Health Organ. Tech. Rep. Ser.* **2010**, *Xii–Xiii*, 1–186.
4. Oliveira, L.F.; Schubach, A.O.; Martins, M.M.; Passos, S.L.; Oliveira, R.V.; Marzochi, M.C.; Andrade, C.A. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the new world. *Acta Trop.* **2011**, *118*, 87–96. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
5. Croft, S.L.; Seifert, K.; Yardley, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J. Med. Res.* **2006**, *123*, 399–410. [[PubMed](#)]
6. Croft, S.L.; Sundar, S.; Fairlamb, A.H. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol. Rev.* **2006**, *19*, 111–126. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
7. De Menezes, J.P.; Guedes, C.E.; Petersen, A.L.; Fraga, D.B.; Veras, P.S. Advances in development of new treatment for leishmaniasis. *BioMed Res. Int.* **2015**, *2015*, 815023. [[CrossRef](#)]
8. Angel, S.O.; Matrajt, M.; Echeverria, P.C. A review of recent patents on the protozoan parasite hsp90 as a drug target. *Recent Pat. Biotechnol.* **2013**, *7*, 2–8. [[CrossRef](#)]
9. Roy, N.; Nageshan, R.K.; Ranade, S.; Tatu, U. Heat shock protein 90 from neglected protozoan parasites. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1823*, 707–711. [[CrossRef](#)]
10. Shonhai, A.; Maier, A.G.; Przyborski, J.M.; Blatch, G.L. Intracellular protozoan parasites of humans: The role of molecular chaperones in development and pathogenesis. *Protein Pept. Lett.* **2011**, *18*, 143–157. [[CrossRef](#)]
11. Wiesgigl, M.; Clos, J. Heat shock protein 90 homeostasis controls stage differentiation in leishmania donovani. *Mol. Biol. Cell* **2001**, *12*, 3307–3316. [[CrossRef](#)]
12. Ahn, H.J.; Kim, S.; Nam, H.W. Molecular cloning of the 82-kda heat shock protein (hsp90) of toxoplasma gondii associated with the entry into and growth in host cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2003**, *311*, 654–659. [[CrossRef](#)]
13. Pallavi, R.; Roy, N.; Nageshan, R.K.; Talukdar, P.; Pavithra, S.R.; Reddy, R.; Venketesh, S.; Kumar, R.; Gupta, A.K.; Singh, R.K.; et al. Heat shock protein 90 as a drug target against protozoan infections: Biochemical characterization of hsp90 from plasmodium falciparum and trypanosoma evansi and evaluation of its inhibitor as a candidate drug. *J. Biol. Chem.* **2010**, *285*, 37964–37975. [[CrossRef](#)]
14. Meyer, K.J.; Shapiro, T.A. Potent antitrypanosomal activities of heat shock protein 90 inhibitors in vitro and in vivo. *J. Infect. Dis.* **2013**, *208*, 489–499. [[CrossRef](#)]
15. Petersen, A.L.; Guedes, C.E.; Versoza, C.L.; Lima, J.G.; de Freitas, L.A.; Borges, V.M.; Veras, P.S. 17-aag kills intracellular leishmania amazonensis while reducing inflammatory responses in infected macrophages. *PLoS ONE* **2012**, *7*, e49496. [[CrossRef](#)]
16. Santos, D.M.; Petersen, A.L.; Celes, F.S.; Borges, V.M.; Veras, P.S.; de Oliveira, C.I. Chemotherapeutic potential of 17-aag against cutaneous leishmaniasis caused by leishmania (viannia) braziliensis. *PLoS Negl. Trop. Dis.* **2014**, *8*, e3275. [[CrossRef](#)]
17. Tokui, K.; Adachi, H.; Waza, M.; Katsuno, M.; Minamiyama, M.; Doi, H.; Tanaka, K.; Hamazaki, J.; Murata, S.; Tanaka, F.; et al. 17-dmag ameliorates polyglutamine-mediated motor neuron degeneration through well-preserved proteasome function in an sbma model mouse. *Hum. Mol. Genet.* **2009**, *18*, 898–910. [[CrossRef](#)]
18. Neckers, L.; Workman, P. Hsp90 molecular chaperone inhibitors: Are we there yet? *Clin. Cancer Res.* **2012**, *18*, 64–76. [[CrossRef](#)]
19. Isaacs, J.S.; Xu, W.; Neckers, L. Heat shock protein 90 as a molecular target for cancer therapeutics. *Cancer Cell* **2003**, *3*, 213–217. [[CrossRef](#)]
20. Zuehlke, A.; Johnson, J.L. Hsp90 and co-chaperones twist the functions of diverse client proteins. *Biopolymers* **2010**, *93*, 211–217. [[CrossRef](#)]
21. Driscoll, J.J.; Chowdhury, R.D. Molecular crosstalk between the proteasome, aggresomes and autophagy: Translational potential and clinical implications. *Cancer Lett.* **2012**, *325*, 147–154. [[CrossRef](#)]
22. Wolff, S.; Weissman, J.S.; Dillin, A. Differential scales of protein quality control. *Cell* **2014**, *157*, 52–64. [[CrossRef](#)]
23. Tyedmers, J.; Mogk, A.; Bukau, B. Cellular strategies for controlling protein aggregation. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 777–788. [[CrossRef](#)]
24. Sittler, A.; Lurz, R.; Lueder, G.; Priller, J.; Lehrach, H.; Hayer-Hartl, M.K.; Hartl, F.U.; Wanker, E.E. Geldanamycin activates a heat shock response and inhibits huntingtin aggregation in a cell culture model of huntington’s disease. *Hum. Mol. Genet.* **2001**, *10*, 1307–1315. [[CrossRef](#)]
25. Mizushima, N.; Komatsu, M. Autophagy: Renovation of cells and tissues. *Cell* **2011**, *147*, 728–741. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
26. Cheng, Y.; Ren, X.; Hait, W.N.; Yang, J.M. Therapeutic targeting of autophagy in disease: Biology and pharmacology. *Pharmacol. Rev.* **2013**, *65*, 1162–1197. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Klionsky, D.J.; Emr, S.D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* **2000**, *290*, 1717–1721. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]

28. Yorimitsu, T.; Klionsky, D.J. Eating the endoplasmic reticulum: Quality control by autophagy. *Trends Cell Biol.* **2007**, *17*, 279–285. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
29. Mizushima, N.; Klionsky, D.J. Protein turnover via autophagy: Implications for metabolism. *Annu. Rev. Nutr.* **2007**, *27*, 19–40. [[CrossRef](#)]
30. Klionsky, D.J.; Abdalla, F.C.; Abeliovich, H.; Abraham, R.T.; Acevedo-Arozena, A.; Adeli, K.; Agholme, L.; Agnello, M.; Agostinis, P.; Aguirre-Ghiso, J.A.; et al. Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy. *Autophagy* **2012**, *8*, 445–544. [[CrossRef](#)]
31. Duzenko, M.; Ginger, M.L.; Brennand, A.; Gualdrón-Lopez, M.; Colombo, M.I.; Coombs, G.H.; Coppens, I.; Jayabalasingham, B.; Langsley, G.; de Castro, S.L.; et al. Autophagy in protists. *Autophagy* **2011**, *7*, 127–158. [[CrossRef](#)]
32. Meijer, W.H.; van der Klei, I.J.; Veenhuis, M.; Kiel, J.A. Atg genes involved in non-selective autophagy are conserved from yeast to man, but the selective cvt and pexophagy pathways also require organism-specific genes. *Autophagy* **2007**, *3*, 106–116. [[CrossRef](#)]
33. Besteiro, S.; Williams, R.A.; Morrison, L.S.; Coombs, G.H.; Mottram, J.C. Endosome sorting and autophagy are essential for differentiation and virulence of leishmania major. *J. Biol. Chem.* **2006**, *281*, 11384–11396. [[CrossRef](#)]
34. Besteiro, S.; Williams, R.A.; Coombs, G.H.; Mottram, J.C. Protein turnover and differentiation in leishmania. *Int. J. Parasitol.* **2007**, *37*, 1063–1075. [[CrossRef](#)]
35. Williams, R.A.; Smith, T.K.; Cull, B.; Mottram, J.C.; Coombs, G.H. Atg5 is essential for atg8-dependent autophagy and mitochondrial homeostasis in leishmania major. *PLoS Pathog* **2012**, *8*, e1002695. [[CrossRef](#)]
36. Meijer, A.J.; Codogno, P. Regulation and role of autophagy in mammalian cells. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **2004**, *36*, 2445–2462. [[CrossRef](#)]
37. Levine, B.; Klionsky, D.J. Development by self-digestion: Molecular mechanisms and biological functions of autophagy. *Dev. Cell* **2004**, *6*, 463–477. [[CrossRef](#)]
38. Levine, B.; Yuan, J. Autophagy in cell death: An innocent convict? *J. Clin. Investig.* **2005**, *115*, 2679–2688. [[CrossRef](#)]
39. Sengupta, S.; Chowdhury, S.; Bosedasgupta, S.; Wright, C.W.; Majumder, H.K. Cryptolepine-induced cell death of leishmania donovani promastigotes is augmented by inhibition of autophagy. *Mol. Biol. Int.* **2011**, *2011*, 187850. [[CrossRef](#)]
40. Cull, B.; Prado Godinho, J.L.; Fernandes Rodrigues, J.C.; Frank, B.; Schurigt, U.; Williams, R.A.; Coombs, G.H.; Mottram, J.C. Glycosome turnover in leishmania major is mediated by autophagy. *Autophagy* **2014**, *10*, 2143–2157. [[CrossRef](#)]
41. Huete-Perez, J.A.; Engel, J.C.; Brinen, L.S.; Mottram, J.C.; McKerrow, J.H. Protease trafficking in two primitive eukaryotes is mediated by a prodomain protein motif. *J. Biol. Chem.* **1999**, *274*, 16249–16256. [[CrossRef](#)]
42. Williams, R.A.; Woods, K.L.; Juliano, L.; Mottram, J.C.; Coombs, G.H. Characterization of unusual families of atg8-like proteins and atg12 in the protozoan parasite leishmania major. *Autophagy* **2009**, *5*, 159–172. [[CrossRef](#)]
43. Bolte, S.; Cordelières, F.P. A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* **2006**, *224*, 213–232. [[CrossRef](#)]
44. Jang, H.H.; Lee, K.O.; Chi, Y.H.; Jung, B.G.; Park, S.K.; Park, J.H.; Lee, J.R.; Lee, S.S.; Moon, J.C.; Yun, J.W.; et al. Two enzymes in one; two yeast peroxiredoxins display oxidative stress-dependent switching from a peroxidase to a molecular chaperone function. *Cell* **2004**, *117*, 625–635. [[CrossRef](#)]
45. Amaravadi, R.K.; Thompson, C.B. The roles of therapy-induced autophagy and necrosis in cancer treatment. *Clin. Cancer Res.* **2007**, *13*, 7271–7279. [[CrossRef](#)]
46. Cervantes, S.; Bunnik, E.M.; Saraf, A.; Conner, C.M.; Escalante, A.; Sardi, M.E.; Ponts, N.; Prudhomme, J.; Florens, L.; Le Roch, K.G. The multifunctional autophagy pathway in the human malaria parasite, plasmodium falciparum. *Autophagy* **2014**, *10*, 80–92. [[CrossRef](#)]
47. Hoppe, H.C.; van Schalkwyk, D.A.; Wiehart, U.I.; Meredith, S.A.; Egan, J.; Weber, B.W. Antimalarial quinolines and artemisinin inhibit endocytosis in plasmodium falciparum. *Antimicrob. Agents Chemother.* **2004**, *48*, 2370–2378. [[CrossRef](#)]
48. Akerfelt, M.; Morimoto, R.I.; Sistonen, L. Heat shock factors: Integrators of cell stress, development and lifespan. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **2010**, *11*, 545–555. [[CrossRef](#)]
49. Hartl, F.U. Molecular chaperones in cellular protein folding. *Nature* **1996**, *381*, 571–579. [[CrossRef](#)]
50. Hartl, F.U.; Bracher, A.; Hayer-Hartl, M. Molecular chaperones in protein folding and proteostasis. *Nature* **2011**, *475*, 324–332. [[CrossRef](#)]
51. Chen, C.Y.; Balch, W.E. The hsp90 chaperone complex regulates gdi-dependent rab recycling. *Mol. Biol. Cell* **2006**, *17*, 3494–3507. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
52. Lotz, G.P.; Brychzy, A.; Heinz, S.; Obermann, W.M. A novel hsp90 chaperone complex regulates intracellular vesicle transport. *J. Cell Sci.* **2008**, *121*, 717–723. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
53. Di Cristina, M.; Dou, Z.; Lunghi, M.; Kannan, G.; Huynh, M.H.; McGovern, O.L.; Schultz, T.L.; Schultz, A.J.; Miller, A.J.; Hayes, B.M.; et al. Toxoplasma depends on lysosomal consumption of autophagosomes for persistent infection. *Nat. Microbiol.* **2017**, *2*, 17096. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
54. Choi, A.M.; Ryter, S.W.; Levine, B. Autophagy in human health and disease. *N. Engl. J. Med.* **2013**, *368*, 651–662. [[CrossRef](#)]
55. Degenhardt, K.; Mathew, R.; Beaudoin, B.; Bray, K.; Anderson, D.; Chen, G.; Mukherjee, C.; Shi, Y.; Gelinas, C.; Fan, Y.; et al. Autophagy promotes tumor cell survival and restricts necrosis, inflammation, and tumorigenesis. *Cancer Cell* **2006**, *10*, 51–64. [[CrossRef](#)]

56. Lum, J.J.; Bauer, D.E.; Kong, M.; Harris, M.H.; Li, C.; Lindsten, T.; Thompson, C.B. Growth factor regulation of autophagy and cell survival in the absence of apoptosis. *Cell* **2005**, *120*, 237–248. [[CrossRef](#)]
57. Nguyen, H.M.; Berry, L.; Sullivan, W.J., Jr.; Besteiro, S. Autophagy participates in the unfolded protein response in *Toxoplasma gondii*. *FEMS Microbiol. Lett.* **2017**, *364*. [[CrossRef](#)]
58. Mizushima, N.; Levine, B.; Cuervo, A.M.; Klionsky, D.J. Autophagy fights disease through cellular self-digestion. *Nature* **2008**, *451*, 1069–1075. [[CrossRef](#)]
59. Chung, Y.; Lee, J.; Jung, S.; Lee, Y.; Cho, J.W.; Oh, Y.J. Dysregulated autophagy contributes to caspase-dependent neuronal apoptosis. *Cell Death Dis.* **2018**, *9*, 1189. [[CrossRef](#)]
60. Williams, R.A.; Tetley, L.; Mottram, J.C.; Coombs, G.H. Cysteine peptidases cpa and cpb are vital for autophagy and differentiation in *Leishmania mexicana*. *Mol. Microbiol.* **2006**, *61*, 655–674. [[CrossRef](#)]
61. Theodoraki, M.A.; Caplan, A.J. Quality control and fate determination of hsp90 client proteins. *Biochim. Biophys. Acta* **2012**, *1823*, 683–688. [[CrossRef](#)]
62. Janen, S.B.; Chaachouay, H.; Richter-Landsberg, C. Autophagy is activated by proteasomal inhibition and involved in aggresome clearance in cultured astrocytes. *Glia* **2010**, *58*, 1766–1774. [[CrossRef](#)]
63. Grumati, P.; Dikic, I. Ubiquitin signaling and autophagy. *J. Biol. Chem.* **2018**, *293*, 5404–5413. [[CrossRef](#)]
64. Grumati, P.; Morozzi, G.; Holper, S.; Mari, M.; Harwardt, M.I.; Yan, R.; Muller, S.; Reggiori, F.; Heilemann, M.; Dikic, I. Full length rtn3 regulates turnover of tubular endoplasmic reticulum via selective autophagy. *Elife* **2017**, *6*. [[CrossRef](#)]
65. Silva-Fernandes, A.; Duarte-Silva, S.; Neves-Carvalho, A.; Amorim, M.; Soares-Cunha, C.; Oliveira, P.; Thirstrup, K.; Teixeira-Castro, A.; Maciel, P. Chronic treatment with 17-dmag improves balance and coordination in a new mouse model of Machado-Joseph disease. *Neurotherapeutics* **2014**, *11*, 433–449. [[CrossRef](#)]
66. Bose, S.; Cho, J. Targeting chaperones, heat shock factor-1, and unfolded protein response: Promising therapeutic approaches for neurodegenerative disorders. *Ageing Res. Rev.* **2017**, *35*, 155–175. [[CrossRef](#)]

# Journal of Visualized Experiments

## Investigating the Phagocytosis of Leishmania using Confocal Microscopy

--Manuscript Draft--

<b>Article Type:</b>	Invited Methods Collection - Author Produced Video
<b>Manuscript Number:</b>	JoVE62459R1
<b>Full Title:</b>	Investigating the Phagocytosis of Leishmania using Confocal Microscopy
<b>Corresponding Author:</b>	Patricia Veras  BRAZIL
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	
<b>Corresponding Author E-Mail:</b>	patricia.veras@fiocruz.br
<b>Order of Authors:</b>	Amanda Paixão Beatriz Dias Luana Palma Natália Tavares Cláudia Brodskyn Juliana Menezes Patricia Veras
<b>Additional Information:</b>	
<b>Question</b>	<b>Response</b>
Please indicate whether this article will be Standard Access or Open Access.	Standard Access (US\$1200)
Please specify the section of the submitted manuscript.	Immunology and Infection
Please confirm that you have read and agree to the terms and conditions of the author license agreement that applies below:	I agree to the <a href="#">Author License Agreement</a>
Please provide any comments to the journal here.	We would like to let you know that the video regarding the manuscript Investigating the Phagocytosis of Leishmania using Confocal Microscopy will be submitted in the near future.
Please indicate whether this article will be Standard Access or Open Access.	Open Access (\$3900)

1  
2

### 3 Investigating the Phagocytosis of *Leishmania* using Confocal Microscopy

4

5 Amanda R. Paixão<sup>1†</sup>, Beatriz R. S. Dias<sup>1†</sup>, Luana C. Palma<sup>1</sup>, Natália M. Tavares<sup>1</sup>, Cláudia I.  
6 Brodskyn<sup>1</sup>, Juliana P. B de Menezes<sup>1</sup> and Patricia S. T. Veras<sup>1,2\*</sup>

7

8 <sup>1</sup> Laboratory of Host-Parasite Interaction and Epidemiology, Gonçalo Moniz Institute

9

10 <sup>2</sup> National Institute of Science and Technology of Tropical Diseases - National Council for  
11 Scientific Research and Development (CNPq)

12

13 <sup>†</sup>These authors have contributed equally to this work

14

#### 15 \*Correspondence:

16 Corresponding Author:

17 [patricia.veras@fiocruz.br](mailto:patricia.veras@fiocruz.br); [pstveras@gmail.com](mailto:pstveras@gmail.com)

18

19

#### 20 SUMMARY

21 The mechanism associated with phagocytosis in *Leishmania* infection remain poorly understood.  
22 Here we described methods to evaluate the early events occurring during *Leishmania* interaction  
23 to the host cells.

24

#### 25 ABSTRACT

26

27 Phagocytosis is an orchestrated process that involves distinct steps: recognition, binding,  
28 and internalization. Professional phagocytes take up *Leishmania* parasites by phagocytosis,  
29 consisting of recognizing ligands on parasite surfaces by multiple host cell receptors. Binding of  
30 *Leishmania* to macrophage membranes occurs through complement receptor type 1 (CR1) and  
31 complement receptor type 3 (CR3) receptors and Pattern Recognition Receptors.  
32 Lipophosphoglycan (LPG) and 63 KDa glycoprotein (gp63) are the main ligands involved in  
33 macrophage-*Leishmania* interactions. Following the initial recognition of parasite ligands by host  
34 cell receptors, parasites become internalized, survive, and multiply within parasitophorous  
35 vacuoles. The maturation process of *Leishmania*-induced vacuoles involves the acquisition of  
36 molecules from intracellular vesicles, including monomeric G protein Rab 5 and Rab 7, lysosomal  
37 associated membrane protein 1 (LAMP-1), lysosomal associated membrane protein 2 (LAMP-2),  
38 and microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3 (LC3). Here we described methods to  
39 evaluate the early events occurring during *Leishmania* interaction with the host cells using  
40 confocal microscopy, including (i) binding, (ii) internalization, and (iii) phagosome maturation. By  
41 adding to the body of knowledge surrounding these determinants of infection outcome, we  
42 hope to improve our understanding of the pathogenesis of *Leishmania* infection and support the  
43 eventual search for novel chemotherapeutic targets.

44

45

## 46 INTRODUCTION

47

48 Leishmaniasis is a neglected tropical disease caused by protozoan parasites of the genus  
49 *Leishmania*, resulting in a broad spectrum of clinical manifestations in the vertebrate host,  
50 including cutaneous leishmaniasis, mucocutaneous leishmaniasis and visceral leishmaniasis<sup>1</sup>. The  
51 World Health Organization (WHO) estimates that over one billion people are at risk, with more  
52 than one million new cases reported per year<sup>2</sup>.

53 *Leishmania* spp. are obligate intracellular protozoans that survive inside host cells,  
54 including monocytes, macrophages and dendritic cells<sup>3</sup>. *Leishmania*-macrophage interaction is a  
55 complex process that involves multiple host cell receptors and parasite ligands either through  
56 direct interaction or by opsonization involving complement receptors<sup>4,5</sup>. Classical surface  
57 receptors, such as CR1, CR3, mannose-fucose, fibronectin, toll-like and scavenger receptors,  
58 mediate parasite attachment to macrophages<sup>6-8</sup>. These receptors recognize molecules on the  
59 surface of *Leishmania*, including the 63 kDa glycoprotein (gp63) and glycolipid lipophosphoglycan  
60 (LPG)<sup>9</sup>. These are the most abundant molecules on the surface of promastigotes and play an  
61 essential role in the subversion of host immune response, favoring the establishment of parasite  
62 infection in mammalian cells<sup>10</sup>. After parasite surface ligands bind to macrophage receptors, F-  
63 actin accumulates on mammalian cell surfaces, surrounding parasites as they are phagocytosed.  
64 Subsequently, this leads to the formation of a parasite-induced compartment termed a  
65 parasitophorous vacuole (PV), which presents phagolysosomal features<sup>11</sup>. Once inside these  
66 phagolysosomes, parasites undergo several alterations essential to survival and multiplication<sup>3</sup>.

67 The biogenesis of PVs is a highly regulated membrane trafficking process critical to the  
68 intracellular survival of this pathogen<sup>12</sup>. The formation of this compartment results from  
69 sequential fusion events between phagosomes and compartments of the host endocytic  
70 pathway. Classical cell biology studies have revealed that the maturation of PVs involves the  
71 acquisition of monomeric G protein Rab 5 and Rab 7 proteins, which are mainly associated with  
72 early and late endosome maturation, respectively<sup>13</sup>. In addition, these compartments acquire  
73 lysosome-associated membrane proteins 1 and 2 (LAMP 1, LAMP 2), the principal protein  
74 constituents of the lysosomal membrane and microtubule-associated protein 1A/1B-light chain 3  
75 (LC3), an autophagosome marker<sup>14</sup>. Despite apparent similarities, the kinetics of PV  
76 formation<sup>15,16</sup> and the morphology of these compartments vary depending on *Leishmania*  
77 species. For example, infection caused by *L. mexicana* or *L. amazonensis* induces the formation  
78 of large compartments containing a great number of parasites<sup>17</sup>. By contrast, other species, such  
79 as *L. braziliensis* and *L. infantum*, form smaller vacuoles that normally contain only one or two  
80 parasites in each vacuole<sup>18</sup>.

81 Despite this knowledge surrounding host cell-*Leishmania* interaction, the initial events  
82 triggered by contact between host receptors and parasite ligands have not been fully elucidated.  
83 These events are known to be determinants of the outcome of parasite infection and are  
84 dependent on parasite species, the type of host cell receptors recruited to recognize parasites  
85 and the activation of macrophage signaling pathways<sup>19,20</sup>. Therefore, it is essential to identify the  
86 molecules involved in the biogenesis of *Leishmania*-induced PVs and determine the role(s)  
87 played by these molecules in infection establishment and outcome. Here we describe a method

88 of monitoring early events occurring during the phagocytosis of *Leishmania*, including binding,  
89 internalization, phagosome formation and maturation. It is our hope that this work will aid in  
90 clarifying the participation of PLC, Akt, Rab5, Rab7 and LC3 in the formation of PVs induced by  
91 different *Leishmania* species. Importantly, this protocol can be used to investigate the  
92 participation of other proteins involved in PV maturation. Future studies will expand the  
93 knowledge surrounding mechanisms involved in *Leishmania*-host cell interaction and contribute  
94 to the design of novel chemotherapeutic strategies.

95

## 96 **PROTOCOL**

97

### 98 **1. Cell cultures**

99

#### 100 **1.1. Human monocyte-derived macrophages**

101 NOTE: Cells were obtained from healthy donors following the approval of procedures by the  
102 National Research Ethics Committees (ID: 94648218.8.0000.0040).

103 NOTE: To obtain human monocyte-derived macrophages for *in vitro* differentiation into  
104 macrophages, collect blood from healthy donors and purify peripheral blood mononuclear cells  
105 (PBMC) as described by D. English and B. R. Andersen <sup>21</sup>.

106

107 1.1.1. After collecting peripheral blood (50 mL), pour it into a heparinized tube, then dilute  
108 blood 1:1 in a phosphate buffer solution (PBS) at room temperature and gently place  
109 diluted heparinized blood on top of previously distributed density gradient medium.

110 1.1.2. Centrifuge the tubes at  $252 \times g$  for 30 min at 24 °C to avoid hemolysis.

111

112 NOTE: Set centrifuge break-off to avoid mixing of gradient layers.

113 NOTE: After centrifugation, discontinuous gradient layers are formed from the bottom to  
114 the top: erythrocytes, density gradient medium, PBMC ring and plasma.

115

116 1.1.3. Transfer the PBMC ring, located between the density gradient medium and plasma  
117 layers, to a new tube and fill with PBS to wash out excess density gradient medium.

118 1.1.4. Wash cells once and centrifuge at  $190 \times g$  for 10 min at 4 °C.

119 1.1.5. Discard the supernatant and resuspend pellet in 1 mL of complete RPMI medium.

120 1.1.6. Count the cells and plate  $2 \times 10^6$  cells in 500  $\mu$ L of Roswell Park Memorial Institute  
121 (RPMI) supplemented with 25 mM N-[2-hydroxyethyl] piperazine-N'-[2-ethane  
122 sulfonic acid] (HEPES), 2 g/L sodium bicarbonate, 2 mM glutamine, 20 g/mL  
123 ciprofloxacin and 10% inactivated Fetal Bovine Serum (FBS) (complete RPMI medium)  
124 for 7 days at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> in a 24-well plate to allow monocytes to differentiate  
125 into macrophages by adhesion.

126

#### 127 **1.2. THP-1 cultures**

128 1.2.1. Grow THP-1 cell line at a concentration of  $2 \times 10^5$  cells in 10 mL complete RPMI  
129 medium in 75 cm<sup>2</sup> culture flask."

130 1.2.2. Maintain cell cultures in an incubator at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub> for 7 days.

- 131 1.2.3. Centrifuge cells at  $720 \times g$  for 10 min at  $4^\circ\text{C}$  and resuspend the pellet in complete  
132 RPMI medium.
- 133 1.2.4. Count cells in a Neubauer chamber.
- 134 1.2.5. Plate cells on 13 mm glass coverslips at a concentration of  $2 \times 10^5$  cells per well in 500  
135  $\mu\text{L}$  of complete RPMI medium containing 100 nM phorbol myristate acetate (PMA) at  
136  $37^\circ\text{C}$  under 5%  $\text{CO}_2$  to allow differentiation of THP1 cells into macrophages.
- 137 1.2.6. After three days, wash twice cells with 0.9% NaCl solution to remove medium  
138 containing PMA.
- 139 1.2.7. Reincubate differentiated THP-1 cells in PMA-free complete RPMI medium at  $37^\circ\text{C}$   
140 under 5%  $\text{CO}_2$  for an additional 2 days before starting experimentation.

## 141 2. Parasite cultures and CellTracker Red staining

142 NOTE: To visualize parasites through fluorescence microscopy, perform staining using CellTracker  
143 Red fluorescent dye (CMTPX). Alternatively, other markers, including carboxyfluorescein can be  
144 used in accordance with manufacturer instructions or promastigotes constitutively expressing  
145 GFP, RFP, or other fluorescent reporter genes.

146 NOTE: Parasites used to infect cells are those at stationary phase of growth obtained from a  
147 promastigote axenic culture of no more than 7 passages.

- 148 2.1 Grow *Leishmania* spp. promastigotes at  $1 \times 10^5$  parasites per 1,000  $\mu\text{L}$  of medium in a cell  
149 culture flask containing 5 mL of Schneider's medium supplemented with 50  $\mu\text{g}/\text{mL}$   
150 gentamicin and 10% FBS.
- 151 2.2 After incubating parasite axenic cultures in a biochemical oxygen demand (B.O.D.)  $24^\circ\text{C}$ ,  
152 perform daily counting in a Neubauer chamber, checking for parasite form (thin, elongated)  
153 and mobility during 5 days. Parasites are considered in stationary phase of growth when two  
154 consecutive counts with 8 hours of interval display similar amounts.
- 155 2.3 Upon reaching the stationary phase of growth, incubate the parasites in 4 mL of 0.9% NaCl  
156 solution with 1  $\mu\text{M}$  CMTPX for 15 min at  $37^\circ\text{C}$  under 5%  $\text{CO}_2$  avoiding contact with light.
- 157 2.4 Add FBS at a 1:1 proportion and incubate parasite suspension for an additional 1 min.
- 158 2.5 Wash parasites thrice with PBS, followed by centrifugation at  $1,781 \times g$  for 10 min.
- 159 2.6 Resuspend parasite pellet in 1,000  $\mu\text{L}$  of RPMI complete medium.
- 160 2.7 Count parasites in a Neubauer chamber.

161  
162

## 163 3. Assessment of *Leishmania* binding to macrophages

- 164 3.1 Seed  $2 \times 10^5$  THP-1 cells or human monocyte-derived macrophages in 500  $\mu\text{L}$  complete RPMI  
165 medium per well on a 24-well plate with 13 mm glass coverslips.
- 166 3.2 Cultivate cells at  $37^\circ\text{C}$  under 5%  $\text{CO}_2$  for 24 h.
- 167 3.3 Wash the cells twice with 0.9% NaCl solution and incubate in complete RPMI medium at  $4^\circ\text{C}$   
168 for 10 min.



- 169 3.4 Add stationary phase promastigotes as described by A. L. Petersen, *et al.* <sup>22</sup> at a 10:1 ratio  
170 to well plates, and then centrifuge at 720 × g for 5 min under 4 °C.  
171 3.5 Incubate at 4 °C for 5 min.  
172 3.6 Wash the cells twice with 0.9% NaCl solution to remove any non-internalized  
173 promastigotes.  
174 3.7 Fix the cells in 4% paraformaldehyde for 15 min at room temperature.  
175 3.8 Incubate the coverslips with 15 mM NH<sub>4</sub>Cl for 15 min at room temperature.  
176 3.9 Wash thrice with PBS 0.15% bovine serum albumin (BSA). Incubate with blocking solution  
177 (3% BSA in PBS) for 1 h at room temperature.  
178 3.10 Wash thrice with PBS and then permeabilize with 0.15% PBS-Saponin for 15 min at room  
179 temperature.  
180 3.12 Add phalloidin (diluted 1:1,200) for 1 h at room temperature and protect from light.  
181 3.13 Mount coverslips using mounting media.  
182 3.14 Acquire images via a confocal fluorescence microscope using a 63×/1.4 objective.

#### 183 4. Assessment of *Leishmania* phagocytosis by macrophages

- 184 4.1 Seed 2 × 10<sup>5</sup> THP-1 cells or human monocyte-derived macrophages in 500 μL complete  
185 RPMI medium per well on a 24-well plate with 13 mm glass coverslips.  
186 4.2 Cultivate cells for 24 h at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub>.  
187 4.3 Wash cells twice in 0.9% NaCl solution and incubate in complete RPMI medium in 24-well  
188 plate at 4 °C for 10 min.  
189 4.4 Add stationary phase *Leishmania* spp. as described by A. L. Petersen, *et al.* <sup>22</sup> at a 10:1  
190 (parasite:host cell) ratio, and then centrifuge at 720 × g for 10 min under 4 °C.  
191 4.5 Incubate cells at 4 °C for 5 min.  
192 4.6 Wash the cells twice with 0.9% NaCl solution to remove any non-internalized  
193 promastigotes.  
194 4.7 Reincubate the cells in supplemented RPMI medium at 37 °C for 1 h.  
195 4.8 Fix the cells with 4% paraformaldehyde for 15 min.  
196 4.9 Mount coverslips using your preferred mounting media.  
197 4.10 Count no less than 400 cells in random fields under a fluorescence microscope using a  
198 100×/1.4 objective.  
199

#### 200 5. Evaluation of *Leishmania*-induced vacuole maturation

201 NOTE: THP-1 cell transfection should be performed as described by M. B. Maess, B. Wittig and  
202 S. Lorkowski <sup>23</sup>. Here we summarize this protocol, with minimal modifications.

203 NOTE: Nucleofection is a specific transfection method that requires a nucleofector. As an  
204 alternative method, cells can be transfected using lipofectamine<sup>24</sup> and lentivirus  
205 transduction<sup>25</sup>.

206 NOTE: To investigate the biogenesis of *Leishmania*-induced PV, transfect THP1 cells with  
207 PLC<sup>26,27</sup>, Akt<sup>26,27</sup>, Rab 5<sup>28-30</sup> or Rab 7<sup>28,29,31</sup> plasmids.

208 NOTE: This methodology can be used to transfect THP-1 cells with other genes than those

209 listed above.

210

211 **5.1** Seed THP-1 cells at  $1.5 \times 10^7$  in 75 cm<sup>2</sup> tissue culture flasks containing 10 mL complete  
212 RPMI medium supplemented with 100 ng/mL PMA and 50  $\mu$ M 2-mercaptoethanol for 48 h.

213 **5.2** Wash cells once in 0.9% NaCl solution.

214 **5.3** Detach cells using a non-enzymatic cell dissociation solution and centrifuge ( $250 \times g$ ) for 5  
215 min at room temperature.

216 **5.4** Resuspend THP-1 cells in 1 mL RPMI medium and perform counts in a Neubauer chamber.

217 **5.5** Centrifuge THP-1 cells again at  $250 \times g$  for 10 min at room temperature.

218 **5.6** Resuspend  $2 \times 10^6$  cells in 100  $\mu$ L of Nucleofector solution and incubate with 0.5  $\mu$ g of the  
219 plasmid coding for the protein of interest, tagged with a fluorescent protein.

220 **5.7** Transfer the suspension containing THP-1 cells and nucleic acid to the Nucleofector  
221 cuvette.

222 **5.8** Transfect THP1 cells using Nucleofector® Program Y-001.

223 **5.9** Recover the transfected cells ( $2 \times 10^6$ ) and seed in 500  $\mu$ L RPMI medium on 24-well plates  
224 with 13 mm glass coverslips

225 **5.10** Incubate THP-1 cells in complete RPMI medium at 37 °C for 0.5, 2, 4, 6, 12 and 24 h.

226 **5.11** Repeat steps 3.13 and 3.14

227

## 228 **6. Evaluation of the recruitment of LC3 to *Leishmania* spp. PVs**

229 NOTE: The autophagic membrane marker LC3 can be used to investigate whether  
230 phagosomes present autophagic features. LC3 recruitment to *Leishmania*-induced PVs can be  
231 assessed during infection by immunolabelling cells with the anti-LC3 antibody, as previously  
232 described by C. Matte, *et al.*<sup>32</sup> and B. R. S. Dias, *et al.*<sup>33</sup>.

233 **6.1** Seed  $2 \times 10^5$  THP-1 cells or human monocyte-derived macrophages in 500  $\mu$ L complete  
234 RPMI medium on a 24-well plate with 13 mm glass coverslips.

235 **6.2** Cultivate cells for 24 h at 37 °C under 5% CO<sub>2</sub>.

236 **6.3** Wash cells twice in 0.9% NaCl solution and incubate in complete RPMI medium.

237 **6.4** Add stationary phase *Leishmania* spp. promastigotes as described by A. L. Petersen, *et al.*<sup>22</sup>  
238 at a 10:1 (parasite: host cells) ratio and centrifuge cells at  $720 \times g$  for 5 min under 4 °C.

239 **6.5** Reincubate at 37 °C for 30 min or 4 h. Then wash twice and fix the cells to evaluate the LC3  
240 recruitment to *Leishmania*-induced PV membranes at the early stages of infection.  
241 Alternatively, to assess LC3 recruitment to PV membranes at later stages of infection, wash  
242 twice another macrophage group at 4 h of infection to remove any non-internalized  
243 promastigotes. Reincubate infected cells in complete RPMI medium for an additional 12 h  
244 and 24 h, to finally wash twice and fix.

245 NOTE: Fixed cells can be kept in PBS or 0.9% NaCl solution at 4 °C until labeling.

246 **6.6** Simultaneously block and permeabilize the fixed cells in 0.1% Triton X-100, 1% BSA, 20%  
247 normal goat serum, 6% non-fat dry milk, and 50% FBS for 20 min at room temperature.

248 6.7 Incubate the cells with anti-LC3 antibody (1: 200) diluted in PBS for 2 h at room  
249 temperature.

250 NOTE: As a negative control of the immunostaining, a group of cells should be incubated with  
251 immunoglobulin G (IgG) from the animal of primary antibody origin in a concentration  
252 equivalent to that used for the primary antibody.

253 6.8 Wash the cells thrice with 0.9% NaCl solution at room temperature.

254 6.9 Incubate the cells with AlexaFluor 488-conjugated goat anti-rabbit IgG (1:500) or your  
255 preferred fluorescent-dye conjugated secondary antibodies for 1 h at room temperature.

256 6.10 Wash the cells thrice with 0.9% NaCl solution at room temperature.

257 6.11 Mount coverslips using your preferred mounting media.

258 6.12 Acquire images via confocal fluorescence microscope using a 63x/1.4 objective.

## 259 7. Confocal microscopy acquisition and Fiji quantification

260 NOTE: Acquiring immunofluorescence images should be performed using a confocal laser  
261 scanning microscope. To reach a better resolution, use an oil-immersion 63x objective lens.

262 7.1 Leave the 13 mm glass coverslips at room temperature and protect them from the light at  
263 least 30 min before the acquisition.

264 7.2 Clean up the coverslips with an absorbent tissue.

265 7.3 Add a drop of immersion oil to the objective and add the slide.

266 7.4 Move the objective up until the oil touches the slide.

267 7.5 Observe and adjust the focus on the microscope and choose the option 63x objective with  
268 oil.

269 7.6 Open the Leica program and adjust the lasers in the 488, 552, and 405 wave lengths.

270 7.7 Select the image resolution 1,024 x 1,024.

271 7.8 Click on the live bottom, set the Z stack, and press the begin option. Then, do it again and  
272 press the end bottom. We recommend 20 µm for slice thickness to get confocal images  
273 with good resolutions.

274 7.9 Wait for the image acquisition, and then select the option "Maximum Projection" in the  
275 Leica tools.

276 7.10 Save the experiment.

277 7.11 Export the lif or tiff format images to a computer and open FIJI program.

278 7.12 Open the experiment and set the view stack with the hyper stack. Then select open files  
279 individually and stitch tiles.

280 7.13 Select the free hands' tool in the Fiji toolbar and trace the cell carefully by hand.

281 7.14 Press the analyze bottom and measure to visualize the fluorescence intensity.

282 7.15 Repeat this process to each cell per group.

283 7.16 Save the measurements and export them to a spreadsheet editor.

284 7.17 Add this data to a statistical analysis program and do the statistical analysis.

## 285 8. Statistical analysis

286 NOTE: For data analysis and graphics, use a statistical analysis program.

- 287 8.1 Open the program.  
288 8.2 Insert the obtained data and test the normality parameters.  
289 8.3 For data with normal distribution, use the Student *t*-test and for nonparametric tests,  
290 Mann-Whitney test.  
291 8.4 Consider data with a statistically significant difference when the *p*-value is less than 0.05.  
292 8.5 Prepare graphics representing the data, with central tendency measures (mean or median)  
293 and variation measures.

294  
295 **REPRESENTATIVE RESULTS**

296  
297 This report aims to evaluate the early events occurring during the phagocytosis of *L.*  
298 *braziliensis* isolated from patients presenting *L. braziliensis*-LCL or *L. braziliensis*-DL form of CL.  
299 Using confocal microscopy, we investigated the main events associated with parasites'  
300 phagocytosis: binding, internalization, and phagosome maturation. We first evaluated the *L.*  
301 *braziliensis*-LCL or *L. braziliensis*-DL binding and phagocytosis by human monocyte-derived  
302 macrophages. Our data show that both *L. braziliensis*-LCL and *L. braziliensis*-DL similarly bind to  
303 macrophages (**Figure 1**). Also, no differences were observed regarding *L. braziliensis*-LCL and *L.*  
304 *braziliensis*-DL phagocytosis by host cells (**Figure 2**). Finally, we compared the recruitment of LC3  
305 to the PVs induced by *L. braziliensis*-LCL or *L. braziliensis*-DL in infected cells. After 4 h of infection,  
306 we observed similar percentages of LC3 decorated PVs in *L. braziliensis*-LCL and *L. braziliensis*-DL-  
307 infected macrophages (**Figure 3**). These representative results showed that *L. braziliensis*-LCL and  
308 *L. braziliensis*-DL similarly interact with macrophages during binding, phagocytosis, and biogenesis  
309 of PVs, concerning the LC3 recruitment.

310  
311 NOTE: Microscopic images representing THP-1 cells efficiently transfected with PLC-GFP,  
312 Rab5-GFP, Rab7-GFP plasmids are shown in **Figure 4**.

313  
314  
315 **FIGURE AND TABLE LEGENDS**

316  
317  
318 [Place figure 1 here]

319 **Figure 1. Evaluation of *L. braziliensis*-LCL and *L. braziliensis*-DL binding to human macrophages.**  
320 Human monocyte-derived macrophages were infected with *L. braziliensis*-LCL- or *L. braziliensis*-  
321 DL. After 10 min at 4 °C, the binding was assessed by confocal microscopy. **(A)** Confocal microscopy  
322 images of *L. braziliensis*-LCL or *L. braziliensis*-DL (labeled with CMTPIX, red) binding to macrophages  
323 (labeled with phalloidin, green). For confocal microscopy, cell nuclei were labeled with DAPI (blue).  
324 Arrows depict *Leishmania*-macrophage binding. **(B)** Percentage of *Leishmania* binding to the  
325 macrophages. A total of 30 cells per group were analyzed. Data represent each replicate of one  
326 experiment performed in quintuplicate (unpaired *t* test, *p* > 0.05).

327  
328

329 [Place figure 2 here]

330 **Figure 2. Evaluation of *L. braziliensis*-LCL and *L. braziliensis*-DL phagocytosis by human macrophages.**

331 Human monocyte-derived macrophages were incubated with *L. braziliensis*-LCL or *L. braziliensis*-  
332 DL for 10 min at 4 °C followed by additional 1 h at 37 °C. Cells were then analyzed by fluorescence  
333 microscopy by counting a total of 400 cells. (a) Confocal microscopy images of human  
334 macrophages infected by *L. braziliensis*-LCL or *L. braziliensis*-DL. For confocal microscopy, cell  
335 nuclei were labeled with DAPI (blue). Arrows depict *Leishmania* parasites nuclei. (b) Percentage of  
336 *Leishmania* phagocytosis. Circles represent data from each replicate of one experiment performed  
337 in triplicate (unpaired *t* test, *p* > 0.05).

338

339 [Place figure 3 here]

340 **Figure 3. Assessment of LC3 recruitment to PVs induced by *L. braziliensis*-LCL or *L. braziliensis*-DL in**  
341 **macrophages.** Human monocyte-derived macrophages were infected and then stained with anti-

342 LC3 antibody for 30 min, 4 and 12 h. (A) Confocal microscopy images of *L. braziliensis*-LCL or *L.*  
343 *braziliensis*-DL-infected macrophages labeled with anti-LC3 followed by the secondary anti-rabbit  
344 IgG antibody conjugated to Alexa Fluor 488 (green). For confocal microscopy, cell nuclei were  
345 labeled with DAPI (blue); (B) Percentage of *L. braziliensis*-LCL or *L. braziliensis*-DL-induced PVs  
346 decorated with LC3-II. A total of 30 cells per group were analyzed. The circles correspond to each  
347 randomly selected field analyzed (unpaired *t* test, *p* > 0.05).

348

349 [Place figure 4 here]

350

351 **Figure 4. THP-1 cells expressing PLC, Rab5 or Rab7.** After differentiating into macrophages, THP-1  
352 cells were subjected to nucleofection with each gene of interest coupled to GFP fluorescent  
353 probes: PLC, Rab5 and Rab7. Subsequently, these cells were fixed, had the nucleus stained with  
354 DAPI (blue) and were observed under a confocal microscope using a 63x / 1.4 objective.

355

356 **DISCUSSION**

357

358 *Leishmania*-macrophage interaction is a complex process and involves several steps that  
359 can influence disease development<sup>5</sup>. To better understand the mechanisms involved in the  
360 interaction of unopsonized *Leishmania* and host cells, we have described a protocol that employs  
361 confocal fluorescence microscopy to assess phagocytosis from early to late stages of *Leishmania*  
362 infection. The use of fluorescence techniques involving two or more fluorophores to investigate  
363 cell biology mechanisms, including immunolabeling and the expression of fluorescent-labeled  
364 proteins, allows us to analyze the location of several proteins, as well as to simultaneously evaluate  
365 cell morphology. The advantages offered by these methods make them the best tools to monitor  
366 pathogen-host cell interaction<sup>34</sup>.

367 To better understand the phagocytic process involving different particles, it is crucial to  
368 analyze this highly dynamic process at the molecular level<sup>35</sup>. Confocal-fluorescence microscopy  
369 has been used for decades to this end, and has been shown to be an excellent tool for quantifying  
370 phagocytosis through the determination of numbers of internalized particles, or the types of  
371 proteins known to be involved in early stages of host-pathogen interaction<sup>34</sup>. The present study

372 proposed the use of confocal microscopy to analyze events occurring during the phagocytosis of  
373 *L. braziliensis* isolated from patients with different clinical forms (LCL and DL). This technique  
374 enables us to study cells expressing specific fluorescent proteins, including PLC, Akt, Rab 5, and  
375 Rab 7, and subsequently evaluate the participation of these proteins in the phagocytosis of  
376 *Leishmania* isolates to identify elements relevant to different infection outcomes.

377 The present study employed primary macrophages and THP1 cells to assess *L. braziliensis*  
378 phagocytosis at early stages of infection. The presently described protocol can also be used to  
379 study phagocytosis in *Leishmania* spp. by other phagocytes, including dendritic cells, monocytes,  
380 macrophage cell-lines, and neutrophils derived from human peripheral blood. During the parasite  
381 internalization process, a dynamic change in F-actin occurs at the cell membrane surface<sup>11</sup>. We  
382 then labeled proteins located in the cell membrane using a specific marker of phagocytosis<sup>36</sup>, such  
383 as fluorescent PLC, which allowed us to observe the binding stage of *Leishmania* to host cells, as  
384 shown in **Figure 4**. Staining parasites with fluorescent markers, such as CMTPIX or CSFE, is also  
385 crucial to assess parasite binding to host cells by immunofluorescence. It is worth noting that this  
386 assay requires careful execution: i) wash coverslips gently using washing solutions at room  
387 temperature (25 °C), otherwise, samples can be damaged; ii) prepare reagent dilutions precisely;  
388 iii) protect the samples from light<sup>34</sup>.

389 A confocal microscope configured to the optimal laser excitement wavelength is capable  
390 of obtaining a high-quality sample images. Labeled cells can be stored for weeks in the dark at 4  
391 °C or frozen until the time of analysis. The use of confocal microscopy to evaluate phagocytosis is  
392 limited by prolonged times of exposure and high intensity laser beams, which can damage  
393 samples, and, in some cases, lead to high levels of background detection in images<sup>35,37</sup>.

394 In the present study, instead of using live imaging to follow the phagocytosis of *Leishmania*  
395 spp., we performed a kinetic study by fixing cells at several early times of infection (30 min, 4 h,  
396 and 12 h). It must be considered that live imaging offers some advantages, such as the potential  
397 to analyze the spatial and temporal dynamics of myriad cellular processes, including phagocytosis,  
398 and capturing details that are not observable in static images<sup>34</sup>. However, live imaging requires  
399 that cells be healthy throughout the entire experimentation process, including controlling  
400 temperature, pH and oxygen conditions in a microscopic chamber. It is important to note that this  
401 cannot be reliably performed at several laboratories around the world.

402 The nucleofection protocol described has demonstrated efficacy in the transfection of THP-1  
403 cells, as previously reported by M. B. Maess, B. Wittig and S. Lorkowski<sup>23</sup>. In this process, it is  
404 crucial to gently detach cells to avoid cell damage or loss in cell viability. Based on our experience,  
405 we recommend using a non-enzymatic cell dissociation solution to detach cells from plates prior  
406 to performing transfection. The authors of the original protocol<sup>23</sup> state that the main limitations  
407 of this procedure are the need for cells to be in suspension during the nucleofection process, and  
408 the fact that inadequate detachment can cause stress. Despite these limitations, the protocol does  
409 allow for reliable transfection, reaching a 90% successful transfection rate without losing cell  
410 viability.

411 The characterization of PVs using a set of endocytic markers, including PLC, Akt, Rab5, and  
412 Rab7, is essential to improving our understanding of *Leishmania* phagocytosis. Identifying new  
413 proteins that participate in PV biogenesis and comprehensively characterizing these  
414 compartments can clarify differences in macrophage response during *Leishmania* spp. infection.  
415 The contribution of our results to the body of knowledge surrounding *Leishmania* infection

416 outcome will undoubtedly advance our understanding of the pathogenesis of *Leishmania* infection  
417 and support the eventual search for novel chemotherapeutic targets. It is worth noting that this  
418 technique can also be extended to other types of studies, including infection by bacteria, yeasts  
419 or bead engulfment by many types of cells<sup>38,39</sup>.

420

421

## 422 ACKNOWLEDGMENTS

423

424 We thank Gonçalo Moniz Institute, Fiocruz Bahia, Brazil and the department of microscopy for  
425 assistance. This work was supported by INOVA-FIOCRUZ number 79700287000, P.S.T.V. holds a  
426 grant for productivity in research from CNPq (305235/2019-2). Plasmids were kindly provided by  
427 Mauricio Terebiznik, University of Toronto, CA. The authors would like to thank Andris K. Walter  
428 for English language revision and manuscript copyediting assistance.

429

## 430 DISCLOSURES

431

432 The funders had no role in study design, data collection or analysis, the decision to publish, or  
433 preparation of the manuscript. The authors declare that the research was conducted in the  
434 absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential  
435 conflict of interest.

436

## 437 REFERENCES

438

- 439 1 Goto, H. & Lauletta Lindoso, J. A. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infect*  
440 *Dis Clin North Am.* **26** (2), 293-307, (2012).
- 441 2 World Health, O. Control of the leishmaniases. *World Health Organ Tech Rep Ser.* (949),  
442 xii-xiii, 1-186, back cover, (2010).
- 443 3 Alexander, J. & Russell, D. G. The interaction of *Leishmania* species with macrophages.  
444 *Adv Parasitol.* **31** 175-254, (1992).
- 445 4 Mosser, D. M. & Rosenthal, L. A. *Leishmania*-macrophage interactions: multiple  
446 receptors, multiple ligands and diverse cellular responses. *Semin Cell Biol.* **4** (5), 315-  
447 322, (1993).
- 448 5 Awasthi, A., Mathur, R. K. & Saha, B. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J*  
449 *Med Res.* **119** (6), 238-258, (2004).
- 450 6 Blackwell, J. M. Role of macrophage complement and lectin-like receptors in binding  
451 *Leishmania* parasites to host macrophages. *Immunol Lett.* **11** (3-4), 227-232, (1985).
- 452 7 Mosser, D. M. & Edelson, P. J. The mouse macrophage receptor for C3bi (CR3) is a major  
453 mechanism in the phagocytosis of *Leishmania* promastigotes. *J Immunol.* **135** (4), 2785-  
454 2789, (1985).
- 455 8 Gough, P. J. & Gordon, S. The role of scavenger receptors in the innate immune system.  
456 *Microbes Infect.* **2** (3), 305-311, (2000).
- 457 9 Russell, D. G. & Wilhelm, H. The involvement of the major surface glycoprotein (gp63) of  
458 *Leishmania* promastigotes in attachment to macrophages. *J Immunol.* **136** (7), 2613-  
459 2620, (1986).

460 10 Handman, E. & Goding, J. W. The Leishmania receptor for macrophages is a lipid-  
461 containing glycoconjugate. *EMBO J.* **4** (2), 329-336, (1985).

462 11 Holm, A., Tejle, K., Magnusson, K. E., Descoteaux, A. & Rasmussen, B. Leishmania  
463 donovani lipophosphoglycan causes periphagosomal actin accumulation: correlation  
464 with impaired translocation of PKC $\alpha$  and defective phagosome maturation. *Cell*  
465 *Microbiol.* **3** (7), 439-447, (2001).

466 12 Vergne, I. *et al.* Mechanism of phagolysosome biogenesis block by viable  
467 *Mycobacterium tuberculosis*. *Proc Natl Acad Sci U S A.* **102** (11), 4033-4038, (2005).

468 13 Courret, N., Lang, T., Milon, G. & Antoine, J. C. Intradermal inoculations of low doses of  
469 *Leishmania major* and *Leishmania amazonensis* metacyclic promastigotes induce  
470 different immunoparasitic processes and status of protection in BALB/c mice. *Int J*  
471 *Parasitol.* **33** (12), 1373-1383, (2003).

472 14 Gutierrez, M. G. *et al.* Autophagy induction favours the generation and maturation of  
473 the Coxiella-replicative vacuoles. *Cell Microbiol.* **7** (7), 981-993, (2005).

474 15 Dermine, J. F., Scianimanico, S., Prive, C., Descoteaux, A. & Desjardins, M. *Leishmania*  
475 promastigotes require lipophosphoglycan to actively modulate the fusion properties of  
476 phagosomes at an early step of phagocytosis. *Cell Microbiol.* **2** (2), 115-126, (2000).

477 16 Desjardins, M. & Descoteaux, A. Inhibition of phagolysosomal biogenesis by the  
478 *Leishmania* lipophosphoglycan. *J Exp Med.* **185** (12), 2061-2068, (1997).

479 17 Antoine, J. C., Prina, E., Lang, T. & Courret, N. The biogenesis and properties of the  
480 parasitophorous vacuoles that harbour *Leishmania* in murine macrophages. *Trends*  
481 *Microbiol.* **6** (10), 392-401, (1998).

482 18 Alexander, J. *et al.* An essential role for IL-13 in maintaining a non-healing response  
483 following *Leishmania mexicana* infection. *Eur J Immunol.* **32** (10), 2923-2933, (2002).

484 19 Aderem, A. & Underhill, D. M. Mechanisms of phagocytosis in macrophages. *Annu Rev*  
485 *Immunol.* **17** 593-623, (1999).

486 20 Olivier, M., Gregory, D. J. & Forget, G. Subversion mechanisms by which *Leishmania*  
487 parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. *Clin Microbiol*  
488 *Rev.* **18** (2), 293-305, (2005).

489 21 English, D. & Andersen, B. R. Single-step separation of red blood cells. Granulocytes and  
490 mononuclear leukocytes on discontinuous density gradients of Ficoll-Hypaque. *J*  
491 *Immunol Methods.* **5** (3), 249-252, (1974).

492 22 Petersen, A. L. *et al.* 17-AAG kills intracellular *Leishmania amazonensis* while reducing  
493 inflammatory responses in infected macrophages. *PLoS One.* **7** (11), e49496, (2012).

494 23 Maess, M. B., Wittig, B. & Lorkowski, S. Highly efficient transfection of human THP-1  
495 macrophages by nucleofection. *J Vis Exp.* 10.3791/51960 (91), e51960, (2014).

496 24 Berges, R. *et al.* End-binding 1 protein overexpression correlates with glioblastoma  
497 progression and sensitizes to Vinca-alkaloids in vitro and in vivo. *Oncotarget.* **5** (24),  
498 12769-12787, (2014).

499 25 Franco, L. H. *et al.* The Ubiquitin Ligase Smurf1 Functions in Selective Autophagy of  
500 *Mycobacterium tuberculosis* and Anti-tuberculous Host Defense. *Cell Host Microbe.* **22**  
501 (3), 421-423, (2017).



502 26 Corbett-Nelson, E. F., Mason, D., Marshall, J. G., Collette, Y. & Grinstein, S. Signaling-  
503 dependent immobilization of acylated proteins in the inner monolayer of the plasma  
504 membrane. *J Cell Biol.* **174** (2), 255-265, (2006).

505 27 Yeung, T. *et al.* Receptor activation alters inner surface potential during phagocytosis.  
506 *Science.* **313** (5785), 347-351, (2006).

507 28 Romano, P. S., Gutierrez, M. G., Beron, W., Rabinovitch, M. & Colombo, M. I. The  
508 autophagic pathway is actively modulated by phase II *Coxiella burnetii* to efficiently  
509 replicate in the host cell. *Cell Microbiol.* **9** (4), 891-909, (2007).

510 29 Vieira, O. V. *et al.* Modulation of Rab5 and Rab7 recruitment to phagosomes by  
511 phosphatidylinositol 3-kinase. *Mol Cell Biol.* **23** (7), 2501-2514, (2003).

512 30 Roberts, R. L., Barbieri, M. A., Ullrich, J. & Stahl, P. D. Dynamics of rab5 activation in  
513 endocytosis and phagocytosis. *J Leukoc Biol.* **68** (5), 627-632, (2000).

514 31 Vitelli, R. *et al.* Role of the small GTPase Rab7 in the late endocytic pathway. *J Biol Chem.*  
515 **272** (7), 4391-4397, (1997).

516 32 Matte, C. *et al.* *Leishmania major* Promastigotes Evade LC3-Associated Phagocytosis  
517 through the Action of GP63. *PLoS Pathog.* **12** (6), e1005690, (2016).

518 33 Dias, B. R. S. *et al.* Autophagic Induction Greatly Enhances *Leishmania major* Intracellular  
519 Survival Compared to *Leishmania amazonensis* in CBA/j-Infected Macrophages. *Front*  
520 *Microbiol.* **9** 1890, (2018).

521 34 Babcock, G. F. Quantitation of phagocytosis by confocal microscopy. *Methods Enzymol.*  
522 **307** 319-328, (1999).

523 35 Sanderson, M. J., Smith, I., Parker, I. & Bootman, M. D. Fluorescence microscopy. *Cold*  
524 *Spring Harb Protoc.* **2014** (10), pdb top071795, (2014).

525 36 Lennartz, M. R. Phospholipases and phagocytosis: the role of phospholipid-derived  
526 second messengers in phagocytosis. *Int J Biochem Cell Biol.* **31** (3-4), 415-430, (1999).

527 37 Rashidfarrokhi, A., Richina, V. & Tafesse, F. G. Visualizing the Early Stages of  
528 Phagocytosis. *J Vis Exp.* 10.3791/54646 (120), (2017).

529 38 Ramarao, N. & Meyer, T. F. *Helicobacter pylori* resists phagocytosis by macrophages:  
530 quantitative assessment by confocal microscopy and fluorescence-activated cell sorting.  
531 *Infect Immun.* **69** (4), 2604-2611, (2001).

532 39 Bain, J., Gow, N. A. & Erwig, L. P. Novel insights into host-fungal pathogen interactions  
533 derived from live-cell imaging. *Semin Immunopathol.* **37** (2), 131-139, (2015).

534  
535