**UFRRJ**

**INSTITUTO DE QUÍMICA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**


# DISSERTAÇÃO

## O PAPEL DE INIBIDORES DE NADPH OXIDASES SOBRE AS ATIVIDADES DA FERRO REDUTASE DE *Leishmania amazonensis* (LFR1) E SUA POSSÍVEL INFLUÊNCIA NA DIFERENCIAÇÃO E INFECTIVIDADE DO PARASITO


**Bárbara de Souza Cardoso**



**2025**

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**
**INSTITUTO DE QUÍMICA**
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

# O PAPEL DE INIBIDORES DE NADPH OXIDASES SOBRE AS ATIVIDADES DA FERRO REDUTASE DE *Leishmania amazonensis* (LFR1) E SUA POSSÍVEL INFLUÊNCIA NA DIFERENCIAÇÃO E INFECTIVIDADE DO PARASITO

**BÁRBARA DE SOUZA CARDOSO**

Sob a Orientação da Professora
**Daniela Cosentino Gomes**

e Co-orientação do Professor
**Cristiano Jorge Riger**

Dissertação submetida como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestra em Química**, no Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Química, Área de Concentração em Química.

Seropédica, RJ
Maio de 2025

C268p

Cardoso, Bárbara de Souza, 1998-
O papel de inibidores de NADPH oxidases sobre as atividades da ferro redutase de Leishmania amazonensis (LFR1) e sua possível influência na diferenciação e infectividade do parasito / Bárbara de Souza Cardoso. - Rio de Janeiro, 2025.
77 f.: il.

Orientadora: Daniela Cosentino Gomes.
Coorientador: Cristiano Jorge Riger.
Dissertação(Mestrado). -- Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Programa de Pós-graduação em Química, 2025.

1. Leishmania amazonensis. 2. Ferro redutase. 3. NADPH oxidase. 4. Inibidores NOXs. 5. Leishmaniose. I. Gomes, Daniela Cosentino, 1981-, orient. II. Riger, Cristiano Jorge, 1972-, coorient. III Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro. Programa de Pós-graduação em Química. IV. Título.

**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DO RIO DE JANEIRO**
**INSTITUTO DE QUÍMICA**
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM QUÍMICA**

**BÁRBARA DE SOUZA CARDOSO**

Dissertação submetida como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestra em Química, no Programa de Pós-Graduação em Química, Área de concentração Química.

DISSERTAÇÃO APROVADA EM 11/07/2025

Daniela Consentino Gomes Drª. UFRRJ (Orientador)

Michelle Tanny Cunha do Nascimento Drª. UFRJ

Marco Edilson Freire de Lima Dr. UFRRJ

***TERMO Nº 592/2025 - PPGQ (12.28.01.00.00.00.60)***

***(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)***

***(Assinado digitalmente em 14/07/2025 11:37 )***
*DANIELA COSENTINO GOMES*
*PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR*
*DBQ (11.39.00.24)*
*Matrícula: ###455#0*

***(Assinado digitalmente em 12/07/2025 10:39 )***
*MARCO EDILSON FREIRE DE LIMA*
*PROFESSOR DO MAGISTERIO SUPERIOR*
*DQO (11.39.00.23)*
*Matrícula: ###587#8*

***(Assinado digitalmente em 14/07/2025 10:48 )***
*MICHELLE TANNY CUNHA DO NASCIMENTO*
*ASSINANTE EXTERNO*
*CPF: ###.###.437-##*

*Visualize o documento original em https://sipac.ufrrj.br/documentos/ informando seu número: **592**, ano: **2025**, tipo: **TERMO**, data de emissão: **11/07/2025** e o código de verificação: **f2e6357c12***

*Aos meus queridos avós José Urbano e*
*Elaide, Trajano e Albertina.*
*Eu jamais os esquecerei.*

## AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar eu sou muito grata a Deus e à intercessão de Nossa Senhora Aparecida e São Judas Tadeu por todo auxílio e permissão para que cada passo fosse dado por mim no desenvolvimento deste trabalho.

Agradeço a toda minha família, por acreditar no meu potencial e por me encorajar a não desistir dos meus objetivos, por mais difíceis que possa ser atingi-los. De maneira especial agradeço ao meu pai, Walfredo, por me incentivar a crescer por meio dos estudos e por me apoiar nas dificuldades; e à minha mãe, Cássia, por dividir comigo sua alegria de viver, por me acolher em meio às tempestades e ao mesmo tempo me ensinar a ter coragem nessa e em outras jornadas da minha vida. Sou muito grata também ao meu irmão Gabriel pelo carinho e orgulho de irmão mais velho e por sempre torcer pela minha felicidade. Amo vocês!

Ao meu namorado, Afonso, agradeço pelo apoio, orientação e parceria até mesmo na vida acadêmica. Você é meu exemplo, e me inspira a cada dia. Obrigada por acreditar em mim em todos os momentos. A UFRRJ é ainda mais linda com você.

Aos meus companheiros de laboratório, em especial à Karine e à Lari, agradeço muito por todo compartilhamento de experiências e conhecimento, amizade e parceria. Os momentos com vocês foram inesquecíveis e fizeram toda a diferença no processo. Aos demais amigos e amigas e suas famílias, obrigada por torcerem pelo meu sucesso!

Agradeço a todos os professores, internos ou externos ao Programa de Pós-graduação em Química da UFRRJ, que de alguma maneira tenham me ajudado neste trabalho.

É impossível deixar de agradecer à minha professora e orientadora, Daniela Cosentino Gomes, por toda disponibilidade, parceria e paciência. Ao meu co-orientador Cristiano Jorge Riger, agradeço pelo incentivo, disponibilidade em ajudar e pelos conselhos para que eu pudesse melhorar a qualidade deste trabalho. Vocês têm minha total admiração como profissionais e me inspiraram muito nesse período.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

# RESUMO

CARDOSO, Bárbara de Souza. **O Papel de Inibidores de NADPH Oxidases sobre as Atividades da Ferro Redutase de *Leishmania amazonensis* (LFR1) e Sua Possível Influência na Diferenciação e Infectividade do Parasito**. 2025. Dissertação (Mestrado em Química, Química Medicinal e Biológica). Instituto de Química, Departamento de Bioquímica, Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

A espécie *Leishmania amazonensis* ocorre em várias partes do Brasil e é o agente causador das leishmanioses cutâneas, transmitidas por insetos vetores flebotomíneos para hospedeiros vertebrados. Durante o ciclo de vida do parasito, há uma alternância entre as formas promastigotas, presentes no vetor, e as formas amastigotas infectivas intracelulares, que surgem da diferenciação dos promastigotas metacíclicos no hospedeiro mamífero. Recentemente, foi descrito que a enzima ferro redutase (LFR1) de *L. amazonensis*, quando ativada por heme, também pode atuar como uma NADPH oxidase (NOX). Esta enzima bifuncional parece estar envolvida no processo de diferenciação do parasito e pode constituir um novo alvo farmacológico. As NOXs estão envolvidas em várias patologias como câncer, doenças cardíacas e neurodegenerativas e, portanto, há uma busca intensa por fármacos que inibam a atividade dessas enzimas. Alguns desses inibidores estão disponíveis comercialmente, como o Setanaxib, GKT136901 e VAS2870. Nesse contexto, a fim de investigar o funcionamento da LFR1 como alvo para a terapia medicamentosa contra as leishmanioses, este estudo avaliou o efeito desses inibidores nas atividades da LFR1 de *L. amazonensis* e verificou seus efeitos na proliferação, diferenciação e infectividade dos parasitos. Além disso, o foi conduzida uma análise *in silico*, que avaliou o possível sítio de interação desses compostos na LFR1. Resultados preliminares usando o reagente Amplex Red® para medir a produção de $H_2O_2$ heme-dependente mostraram o Setanaxib a 15 µM, GKT136901 a 2,5 µM e o VAS2870 em concentrações tão baixas quanto 1 µM foram capazes de abolir totalmente a atividade NOX da LFR1. O efeito citotóxico desses inibidores contra formas promastigotas também foi avaliado através do teste MTT, em que somente o VAS2870 exibiu efeito tóxico, mostrando perda de 25% e 90% da viabilidade celular na presença de 10 µM do inibidor, após 24h e 72h, respectivamente. Na atividade ferro-redutásica da LFR1, medida através de método colorimétrico com o reagente $K_3Fe(CN)_6$, o promissor inibidor VAS2870 a 1 µM não mostrou efeito inibitório significativo, porém inibiu essa atividade em concentrações acima de 5 µM. A análise *in silico*, que visou demonstrar a possível interação entre o VAS2870 com o domínio desidrogenase da LFR1, cuja estrutura foi modelada *ab initio*, mostrou que esse inibidor interage covalentemente com o sítio ativo da enzima de forma estável. Em culturas axênicas que estimulam a diferenciação de promastigotas para amastigotas, o VAS2870 parece atuar inibindo esse processo em concentrações não-citotóxicas, embora não tenha exercido efeito sob a infecção de *L. amazonensis* em macrófagos murinos. Esses resultados sugerem que o VAS2870 pode atuar em ambas as atividades da LFR1, exercendo efeitos no ciclo de vida de *L. amazonensis*. Diante disso, não é descartada a necessidade de estudos mais profundos a respeito dos efeitos desses e de outros inibidores NOX na LFR1.



**Palavras-chave:** *Leishmania amazonensis*, NADPH oxidases, LFR1.

## ABSTRACT

CARDOSO, Bárbara de Souza. **The Role of NADPH Oxidases Inhibitors on *Leishmania amazonensis* Ferric Iron Reductase (LFR1) Activities and Their Possible Influence on Parasite Differentiation and Infectivity.** 2025. Dissertation (Master's Degree in Chemistry, Medicinal and Biological Chemistry). Institute of Chemistry, Department of Biochemistry, Federal Rural University of Rio de Janeiro, Seropédica, RJ, 2025.

The species *Leishmania amazonensis* is found in various parts of Brazil and is the causative agent of cutaneous leishmaniasis, transmitted by phlebotomine insect vectors to vertebrate hosts. During the parasite's life cycle, there is an alternation between the promastigote forms, present in the vector, and the intracellular infective amastigote forms, which arise from the differentiation of metacyclic promastigotes within the mammalian host. Recently, it has been described that the ferric reductase enzyme (LFR1) of *L. amazonensis*, when activated by heme, can also function as a NADPH oxidase (NOX). This bifunctional enzyme appears to be involved in the parasite's differentiation process and may constitute a new pharmacological target. NOXs are involved in various pathologies such as cancer, cardiac, and neurodegenerative diseases; therefore, there is an intense search for drugs that inhibit the activity of these enzymes. Some of these inhibitors are commercially available, such as Setanaxib, GKT136901, and VAS2870. In this context, to investigate LFR1 as a new target for drug therapy against leishmaniasis, this study aims to analyze the effects of Setanaxib, GKT136901, and VAS2870 on LFR1 activities from *L. amazonensis* and to evaluate their effects on parasite proliferation, differentiation and infectivity. Additionally, an *in silico* analysis of the possible inhibitor-LFR1 interactions is performed. Preliminary results using the Amplex Red® reagent to measure heme-dependent $H_2O_2$ production showed that Setanaxib at 15 μM, GKT136901 at 2.5 μM, and VAS2870 at concentrations as low as 1 μM completely abolished NOX activity. The cytotoxic effects of these inhibitors against promastigote forms were also assessed via the MTT assay, revealing that only VAS2870 exhibited toxicity, causing a 25% and 90% reduction in cell viability at 10 μM concentration after 24 and 72 hours, respectively. Regarding the ferric reductase activity of LFR1, measured through a colorimetric method with $K_3Fe(CN)_6$ reagent, the promising inhibitor VAS2870 at 1 μM showed no significant inhibitory effect but suppressed activity at concentrations above 5 μM. The *in silico* study, which aimed to demonstrate the potential interaction between VAS2870 and the dehydrogenase domain of LFR1, modeled *ab initio*, showed that this inhibitor may form covalent and stable interactions with the enzyme's active site. In axenic cultures that stimulate promastigote-to-amastigote differentiation, VAS2870 appears to inhibit this process at non-cytotoxic concentrations, although it did not influence *L. amazonensis* infection in murine macrophages. These results suggest that VAS2870 can affect both activities of LFR1, impacting the life cycle of *L. amazonensis*. Furthermore, the possibility of further studies on the effects of these and other NOX inhibitors on LFR1 remains open.



**Keywords:** *Leishmania amazonensis*, NADPH oxidases, LFR1.

## LISTA DE ABREVIAÇÕES E SIGLAS

AmB Anfotericina B

ANOVA Análise de Variância (do inglês *Analysis of Variance*)

CDC Centros de Prevenção e Controle de Doenças (do inglês *Centers for Disease Control and Prevention*)

CTE Cadeia transportadora de elétrons

CTT Catalase

DMSO Dimetilsulfóxido

DPI Difenilenoiodônio

DUOX1 Oxidase dupla 1

DUOX2 Oxidase dupla 2

EMBL-EBI Instituto Europeu de Bioinformática - Laboratório Europeu de Biologia Molecular (do inglês *European Molecular Biology Laboratory - European Bioinformatics Institute*)

FAD Flavina Adenina Dinucleotídeo reduzida

$FADH_2$ Flavina Adenina Dinucleotídeo

FRE Ferro redutase

GPx Glutationa peroxidase

GSH Glutationa

HBSS Solução salina equilibrada de Hank (do inglês *Hanks' Balanced Salt Solution*)

HRP Peroxidase de Rabanete (do inglês *Horseradish Peroxidase)*

IBEs Inibidores da biossíntese de ergosteroisergosteróis

LC Leishmaniose cutânea

LCD Leishmaniose cutânea difusa

LFR1 Ferro redutase 1 de *Leishmania*

LHR-1 Transportador de heme de *Leishmania*

LIR-1 Exportador de ferro de *Leishmania*

LMC Leishmaniose mucocutânea

LPG Lipofosfoglicano

LV Leishmaniose visceral

MAPA Ministério da Agricultura e Pecuária

MTT 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio

| | |
|---|---|
| NADH | Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo |
| NADPH | Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato |
| NOX | NADPH oxidase |
| NOX1 | NADPH oxidase 1 |
| NOX2 | NADPH oxidase 2 |
| NOX3 | NADPH oxidase 3 |
| NOX4 | NADPH oxidase 4 |
| NOX5 | NADPH oxidase 5 |
| NOXA1 | Ativador de NADPH oxidase 1 |
| NOXO1 | Organizador de NADPH oxidase 1 |
| OMS | Organização Mundial da Saúde |
| OPAS | Organização Pan-Americana da Saúde |
| PBS | Tampão fosfato-salino (do inglês *phosphate buffered saline*) |
| ROS | Espécies reativas de oxigênio (do inglês *Reactive Oxygen Species*) |
| RPMI | do inglês *Roswell Park Memorial Institute* |
| SOD | Superóxido dismutase |
| α-KGDH | α-cetoglutarato desidrogenase |

# ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1. O flebotomínio mosquito-palha..... 16**

**Figura 2. Ciclo de vida de *Leishmania spp*..... 17**

**Figura 3. Endemicidade global da leishmaniose cutânea em 2022..... 19**

**Figura 4. Principais manifestações das leishmanioses..... 21**

**Figura 5. Estruturas químicas dos antimoniais pentavalentes utilizados contra as leishmanioses..... 22**

**Figura 6. Estruturas químicas dos principais medicamentos utilizados contra as leishmanioses..... 23**

**Figura 7. Representação das isoformas das NADPH oxidases (NOXs) e suas atividades catalíticas..... 29**

**Figura 8. Inibidores de NADPH oxidases (NOX)..... 32**

**Figura 9. Modelo da topologia de membrana prevista da LFR1..... 34**

**Figura 10. Atividade NADPH oxidase da LFR1 na presença do inibidor Setanaxib..... 43**

**Figura 11. Atividade NADPH oxidase da LFR1 na presença do inibidor GKT136901..... 45**

**Figura 12. Atividade NADPH-oxidase de *L. amazonensis* em presença do inibidor VAS2870..... 46**

**Figura 13. Efeito citotóxico dos inibidores Setanaxib, GKT136901 e VAS2870 frente *L. amazonensis*..... 49**

**Figura 14. Efeito do VAS2870 na atividade ferro-redutásica da LFR1..... 51**

**Figura 15. Estrutura do aduto VAS2870-cisteína no domínio DH da csNOX5..... 54**

**Figura 16. Alinhamento do modelo *ab initio* do domínio DH da LFR1 de *L. amazonensis*..... 55**

**Figura 17. Modo de interação entre o inibidor VAS2870 (ligante) e o domínio DH (receptor)..... 57**

**Figura 18. Inibição da diferenciação axênica de promastigotas para amastigotas pelo inibidor VAS2870. ..... 60**

**Figura 19. Infecção de macrófagos peritoneais murinos por *L. amazonensis* em presença do inibidor VAS2870..... 63**

**Figura 20. Infecção de macrófagos murinos RAW por *L. amazonensis* em presença do inibidor VAS2870..... 63**

**Figura 21. Imagens por microscopia de infecção de macrófagos por *L. amazonensis*..... 64**

.

**SUMÁRIO**

**1. INTRODUÇÃO** ..... **12**
**2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA** ..... **15**
2.1. Modelo de Estudo: *Leishmania amazonensis* ..... 15
2.1.1. O gênero *Leishmania* ..... 15
2.1.2. Ciclo de vida ..... 15
2.2. As Leishmanioses ..... 18
2.2.1. Epidemiologia ..... 18
2.2.2. Manifestações clínicas das leishmanioses ..... 19
2.2.3. Prevenção e tratamento ..... 22
2.3. Espécies Reativas de Oxigênio ..... 24
2.3.1. Estresse Oxidativo ..... 25
2.3.2. Espécies Reativas de Oxigênio e Sinalização Celular ..... 26
2.3.3. A Espécie Ânion Radical Superóxido ($O_2^{\bullet-}$) ..... 26
2.3.4. A Espécie Peróxido de Hidrogênio ($H_2O_2$) ..... 26
2.3.5. Principais Fontes de Espécies Reativas de Oxigênio ..... 27
2.4. A Família das NADPH Oxidases ..... 28
2.4.1. Inibidores das NADPH Oxidases ..... 31
2.5. A Família das Ferro Redutases ..... 33
2.5.1. A Ferro redutase de *Leishmania* (LFR1) ..... 33
2.5.2. A atividade NADPH oxidase da LFR1 ..... 34
**3. OBJETIVO GERAL** ..... **35**
3.1. Objetivos específicos ..... 35
**4. MATERIAIS E MÉTODOS** ..... **35**
4.1. Cultura de Parasitos ..... 35
4.2. Produção de Peróxido de Hidrogênio ..... 36
4.3. Teste de Viabilidade Celular de Formas Promastigotas por MTT ..... 36
4.4. Atividade Ferro-redutase da LFR1 de *Leishmania amazonensis* ..... 37
4.5. Análise *in silico* ..... 37
4.6. Teste de inibição da diferenciação axênica de formas promastigotas para amastigotas pelo inibidor VAS2870 ..... 39
4.7. Infecção de macrófagos murinos com *L. amazonensis* ..... 39
4.7.1. Considerações éticas ..... 40
4.8. Análise estatística ..... 40
**5. RESULTADOS E DISCUSSÃO** ..... **41**
5.1. Capacidade inibitória dos compostos Setanaxib, GKT136901 e VAS2870 frente à atividade NOX da LFR1 ..... 42
5.2. Efeito citotóxico dos inibidores Setanaxib, GKT136901 e VAS2870 frente a *L. amazonensis* ..... 47
5.3. Efeito do VAS2870 na atividade ferro-redutase da LFR1 ..... 50
5.4. Análise *in silico* ..... 53

5.5. Inibição da diferenciação axênica de promastigotas para amastigotas pelo inibidor VAS2870 58
5.6. Infecção de macrófagos por *L. amazonensis* na presença do inibidor VAS2870 ..... 62
**6. CONCLUSÕES ..... 65**
**7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS ..... 66**

# 1. INTRODUÇÃO

As leishmanioses são antropozoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. São doenças tropicais infecciosas e negligenciadas que causam grandes prejuízos à saúde pública. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), mais de 1 bilhão de pessoas que vivem em áreas endêmicas encontram-se sob risco; e cerca de 1 milhão de novos casos surgem a cada ano, estando entre as maiores causas de mortalidade dentre as doenças parasitárias (OMS, 2024). A maioria dos casos de leishmaniose concentra-se em países em desenvolvimento do sudeste da Ásia, leste da África e América Latina. Destes, 90% são localizados no Afeganistão, Paquistão, Síria, Arábia Saudita, Irã, Peru e Brasil (Burza *et al*., 2018).

Protozoários do gênero *Leishmania* são transmitidos pela picada do inseto vetor flebotomíneo dos gêneros *Phlebotomus sp*. (África, Ásia e Europa) ou *Lutzomyia sp*. (América Central e do Sul). As leishmanioses apresentam duas manifestações clínicas principais distintas: leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose visceral (LV). A LC é a forma mais comum da doença e causa no indivíduo lesões ulcerativas na pele que se desenvolvem no local da picada do inseto ou pode se manifestar eu outros locais; A LC também compreende outras formas clínicas mais graves e/ou raras (leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose mucocutânea (LMC)) que dependem da espécie de *Leishmania* envolvida, bem como o tipo de resposta imune do hospedeiro. Já a LV é a forma clínica mais grave dessa doença, que afeta órgãos internos do indivíduo como baço e fígado, sendo letal em cerca de 90% dos casos quando não tratados. Esta manifestação está associada a infecção por *L. donovani* e *L. infantum*. No Brasil, embora exista uma tendência de queda de número de casos para a LC ao longo dos anos, na última década o país registrou uma média de mais de 17000 casos. Nas Américas, países como Argentina, Equador e México, há registros de que a LC vem aumentando. No Paraguai, Bolívia e Peru, a LCD alcança proporções cada vez maiores de novos casos registrados nos últimos 10 anos. Esses dados são preocupantes pois essas formas clínicas exigem acompanhamento rigoroso devido a possibilidade de agravamento da doença o que gera prejuízos para toda a vida ao indivíduo infectado.

O tratamento das leishmanioses a partir de quimioterápicos é a opção mais apropriada de manejo dessas doenças até o momento, embora ainda represente diversos desafios ligados à natureza dessas infecções. Os medicamentos utilizados como primeira escolha na clínica são os antimoniais pentavalentes (antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio)

introduzidos empiricamente desde os anos de 1940. Para os casos de resistência ou refratários aos antimoniais, os utilizados são a pentamidina e a anfotericina B. No entanto, todas essas opções apresentam custo elevado, com dificuldade de administração pelos pacientes além de requererem doses diárias e, muitas vezes por um longo período. Devido à elevada toxicidade, alguns desses medicamentos apresentam efeitos adversos graves, levando muitos pacientes a abandonarem o tratamento, o que favorece o desenvolvimento de resistência pelos parasitos aos fármacos utilizados. Existem alternativas a partir do reposicionamento de fármacos, como a miltefosina, que foi apresentada como o primeiro fármaco oral eficaz no tratamento da LV, contudo, tem apresentado efeitos teratogêncios (Jain & Jain, 2018).

Os parasitos de *Leishmania* possuem um complexo ciclo de vida que está atrelado à sua sobrevivência em seres humanos ou outros mamíferos vertebrados (mamíferos-reservatório) resultante da transmissão pelo inseto vetor. Nesse ciclo, os parasitos se adaptaram assumindo diferentes formas alternativas que dependem das condições em que se encontram. As formas promastigotas procíclicas estão presentes no interior do flebotomíneo e, ao tornarem-se infectivas (promastigotas metacíclicos), no repasto sanguíneo do inseto, são transmitidas aos mamíferos e diferenciam-se para as formas amastigotas infectivas, que proliferam-se no interior dos macrófagos do hospedeiro mamífero e estabelecem a infecção.

Trabalhos recentes relacionam a importância da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*) em eventos de proliferação e diferenciação em *Leishmania spp*. Nesses protozoários, a geração de ROS é frequentemente associada a cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria do parasito e/ou a enzimas redox presentes no seu metabolismo. As enzimas NADPH oxidases (NOXs) são oxidases dependentes de NADPH que catalisam exclusivamente a geração de ROS, frequentemente superóxido ($O_2^{\bullet-}$), com produção secundária de peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$), a partir do oxigênio molecular ($O_2$). A primeira NOX descrita, hoje conhecida como NOX2, é uma enzima presente em algumas células do sistema imune (*e.g.*, neutrófilos e macrófagos), capaz de gerar ROS como parte do mecanismo imune inato contra microrganismos invasores. Posteriormente, outras isoformas foram descritas em células não fagocíticas e das quais são relatadas sete isoformas presentes em mamíferos (NOX1-5, DUOX1 e 2), que são expressas em diversos de tecidos. Essas oxidases geram ROS de uma forma regulada em resposta a diferentes estímulos. Diante da ampla expressão dessas enzimas em diferentes células de organismos superiores, torna-se cada vez mais evidente que a geração de ROS intencional desempenha funções importantes em diversos processos fisiológicos. No entanto, a desregulação dessas enzimas também vêm sendo associadas ao progresso de diversas patologias como diabetes, doenças neurodegerativas,

cardiovasculares e cânceres. Por isso, as NOXs tornaram-se alvos interessantes para o desenvolvimento de diversos inibidores.

Diante da relevância no estudo da família das NOXs em mamíferos, não há muitas informações da função dessas enzimas em microorganismos. Embora nunca tenha sido relatada a existência de uma enzima NOX em tripanossomatídeos, recentemente foi relatado que o heme, nutriente essencial que *Leishmania* necessita adquirir do hospedeiro, ativa uma enzima ferro redutase (LFR1) que passa a ter uma atividade NOX, capaz de geral altos níveis de $H_2O_2$. Trata-se de uma enzima bifuncional, nunca antes descrita em nenhum outro organismo, que constitui uma nova fonte geradora de ROS em *Leishmania*. Nesse caso, o heme atuaria como uma molécula sinalizadora ativando a produção de $H_2O_2$ através da LFR1. Observou-se também que a superexpressão de LFR1 estimula a diferenciação do protozoário de suas formas promastigotas para as formas amastigotas infectivas, constituindo assim um potencial alvo terapêutico para bloquear o ciclo de vida da *Leishmania* (Rocco-Machado *et al*., 2019). Nesse contexto, a busca por compostos que possam atuar na inibição de atividades da LFR1 fornecer informações valiosas a respeito do mecanismo de ação dessa enzima e de seu papel fundamental no estabelecimento da infecção gerada por diversas espécies de *Leishmania*.

Uma estratégia que se torna interessante é a investigação dos efeitos de conhecidos inibidores de NOXs, como o Setanaxib, GKT136901 e VAS2870, nas atividades da LFR1 de *Leishmania* e assim verificar o possível papel desses compostos na proliferação, diferenciação e infecção por esses parasitos.

O Setanaxib foi desenvolvido pela Genkyotex, patenteado em 2007, e é o primeiro inibidor a avançar para a fase clínica em diversos modelos de patologias, sendo descrito como um eficaz inibidor de NOX1/4. O GKT136901 pertence à mesma classe do Setanaxib e exibe capacidade inibitória similar, porém o composto possui propriedades farmacocinéticas diferentes. O VAS2870 é um inibidor inicialmente desenvolvido para inibição da NOX2, pela Vasopharm, patenteado em 2005, e é descrito como um inibidor “pan-NOX” por ser capaz de inibir outras isoformas.

Esse cenário possibilita a formulação da hipótese de que a inibição da enzima LFR1 por compostos inibidores de NOXs pode ocorrer de forma seletiva e atenuar eventos associados à virulência do parasito. Considerando que ainda não existem vacinas para humanos contra as leishmanioses, além da toxicidade significativa dos principais tratamentos atuais e o surgimento de cepas resistentes a esses fármacos, é fundamental a investigação de compostos que atuem de forma seletiva em estruturas celulares específicas nesses protozoários. Portanto, este trabalho busca ampliar o conhecimento a respeito da LFR1 de *Leishmania*, e contribuir para o

entendimento de um possível alvo quimioterápico contra as leishmanioses, por meio de modelos experimentais que investiguem o impacto de inibidores NOX nessa enzima indispensável para o metabolismo de *Leishmania spp*.

# 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

## 2.1. Modelo de Estudo: *Leishmania amazonensis*

### 2.1.1. O gênero *Leishmania*

O gênero *Leishmania* consiste em protozoários da ordem Kinetoplastida e família Trypanosomatidae, na qual estão incluídas mais de 20 espécies diferentes. *Leishmania* recebe duas classificações de subgênero, que são baseadas em diferenças anatômicas dos sítios em que estes microorganismos se desenvolvem no aparelho intestinal de seu vetor. São eles o subgênero *Leishmania*, encontrado nas Américas; e *Viannia*, presente na Europa, Ásia e África (Pace, 2014).

Geograficamente, as espécies e subespécies exibem diversas variações entre regiões endêmicas, principalmente de países tropicais e subtropicais. Este gênero possui destaque por seu papel como patógenos humanos. *Leishmania* são, portanto, parasitos heteroxênicos com complexo ciclo de vida zoonótico ou antroponótico, transmitidos por insetos flebotomíneos hematófagos (Afrin *et al.*, 2019; Akhoundi *et al*., 2016).

### 2.1.2. Ciclo de vida

A sobrevivência do parasito depende da transmissão antroponótica ou zoonótica bem-sucedida entre o inseto vetor e um mamífero reservatório (Pace, 2014). Os vetores das espécies de *Leishmania* patogênicas a humanos são dípteros fêmeas do flebotomínio pertencente à família Psychodidae e à subfamília Phlebotominae e são vulgarmente conhecidos como “mosquito-palha” (**Figura 1A**). As fêmeas desses insetos se alimentam do sangue de mamíferos, que podem atuar como reservatórios do parasito. Cerca de 70 espécies que incluem roedores, cães, gatos, marsupiais e outros mamíferos estão sujeitas a esse processo infectivo (Kaufer *et al*., 2017). Dessa forma, os protozoários são capazes de assumir diferentes formas, com características específicas que garantam um complexo ciclo de infecção em seus hospedeiros vertebrados.

Num primeiro momento formas amastigotas são adquiridas pelo flebotomíneo através do repasto sanguíneo em uma picada a um mamífero já infectado (Bates, 2008). Assim, no lúmen do intestino médio do inseto, os parasitos e diferenciam-se para a forma promastigota procíclica não-infectiva a mamíferos, na qual desenvolvem um flagelo funcional. Após superarem a matriz peritrófica, os parasitos aderem-se ao epitélio do intestino médio do flebotomíneo, através de moléculas em sua superfície como o lipofosfoglicano (LPG), e replicam-se extracelularmente (Clos *et al*., 2022). Devido à diminuição da disponibilidade nutricional e alterações ambientais, ocorre o processo de metaciclogênese, em que os parasitos se diferenciam para as formas promastigotas metacíclicas, infectivas, não-replicativas e ativamente móveis. Esses promastigotas, então, migram para a região anterior do intestino e colonizam a válvula estomodeal, onde estão prontas para a transmissão pelo vetor num novo repasto sanguíneo (**Figura 1B**) (Baker *et al*., 2021)

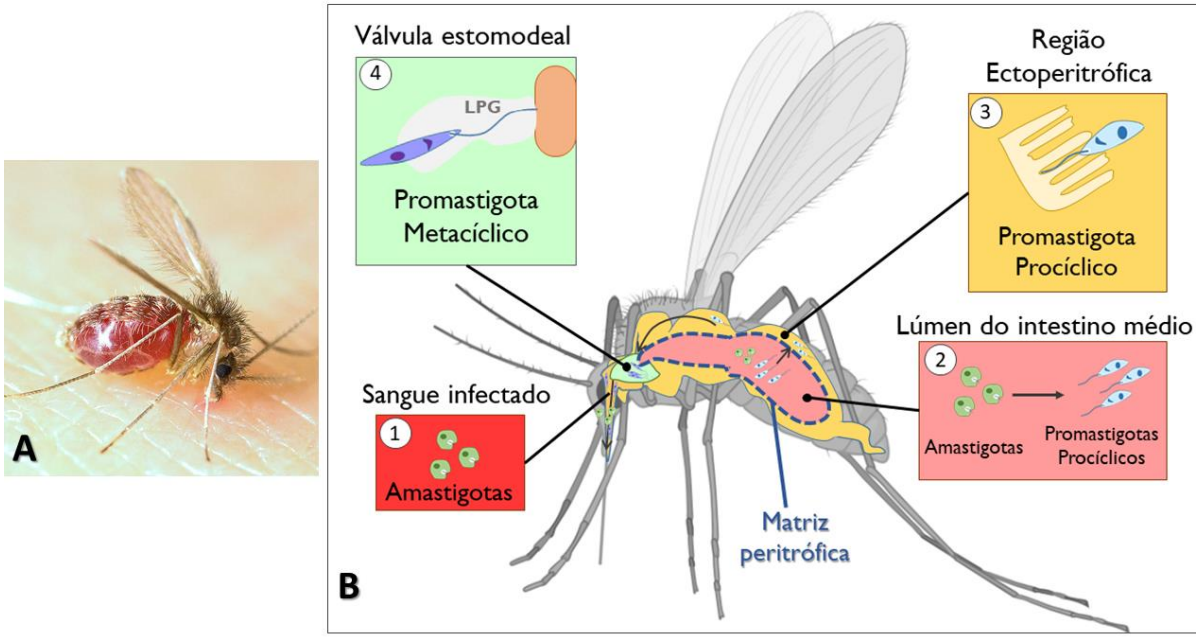



**Figura 1. O flebotomínio mosquito-palha; A)** Imagem do inseto**; B)** Representação esquemática simplificada do desenvolvimento de *Leishmania* nas diferentes regiões do intestino médio do flebotomínio: 1) Após a repasto sanguíneo, amastigotas são ingeridos pelo inseto; 2) No lúmen de seu intestino médio, os amastigotas se diferenciam em promastigotas procíclicos; 3) Os parasitos ultrapassam a matriz peritrófica e se aderem às microvilosidades do epitélio no intestino médio; 4) Promastigotas procíclicos se diferenciam em promastigotas metacíclicos e migram para a válvula estomodeal (Adaptado de (Cecílio *et al*., 2022; Tom *et al*., 2024); De Pablos *et al*., 2016). Imagem editada com auxílio do software gratuito *Biorender*).

Assim que os promastigotas metacíclicos são inoculados na pele do hospedeiro, leucócitos recrutados, e principalmente macrófagos, fagocitam esses protozoários. Nessas células, os parasitos diferenciar-se-ão para as formas amastigotas, de formato esférico, tamanho

reduzido, flagelo encurtado e imóveis (Costa-da-silva *et al*., 2022). Nesse estágio intracelular, amastigotas multiplicam-se em compartimentos chamados fagolisossomos, até que se atinja uma alta carga parasitária que cause o rompimento da célula, disseminando a infecção entre fagócitos locais. Diante das mudanças morfológicas e bioquímicas sofridas até esse estágio, os parasitos tornam-se capazes de resistir a fatores hostis nos fagolisossomos, como baixo pH e a ação de hidrolases lipossomais (Paul *et al*., 2024); além de alterarem sua expressão gênica e inibirem a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) nesses compartimentos (Costa-da-Silva *et al*., 2022). Uma representação esquemática do ciclo de vida encontra-se abaixo (**Figura 2**).

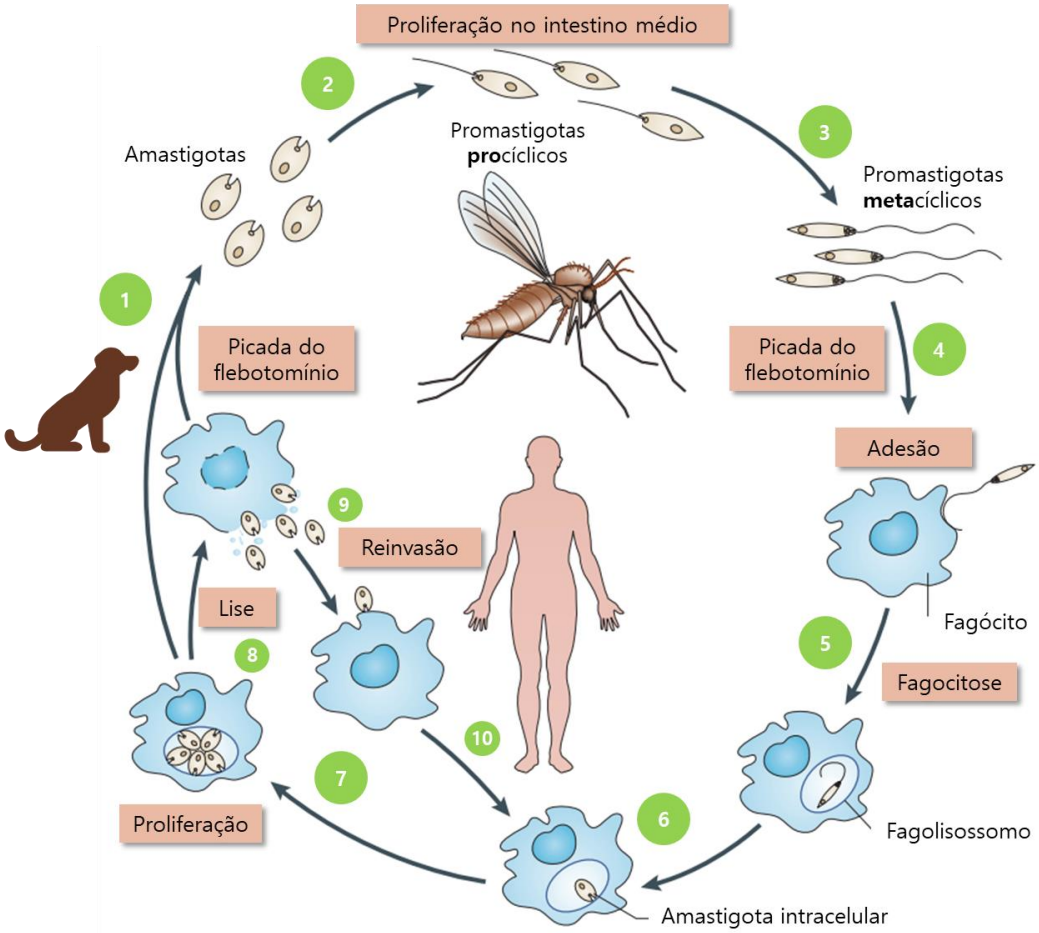



**Figura 2. Ciclo de vida de *Leishmania spp*.** 1) Através da picada do mosquito-palha a um mamífero infectado, fagócitos contendo formas amastigotas (sem flagelo) são ingeridos pelo inseto. 2) em seu intestino médio, os amastigotas são liberados e se convertem em formas promastigotas (com flagelo) procíclicas. 3) Os promastigotas se diferenciam em promastigotas metacíclicos, formas não-proliferativas e infectivas do parasito, e se deslocam para a válvula estomodeal, estando então prontos para a transmissão. 4) Durante o repasto sanguíneo, o mosquito-palha regurgita os promastigotas procíclicos juntamente com proteofosfoglicanos imunomodulatórios derivados do parasito bem como outros componentes salivares. 5) Os promastigotas metacíclicos, após aderirem-se à superfície de células do sistema imune inato do hospedeiro vertebrado, são fagocitados e estabelecem-se intracelularmente nos fagolisossomos. 6) Os parasitos diferenciam-se para formas amastigotas; 7) As amastigotas replicam-se no interior das células hospedeiras. 8) Ocorre a lise dessas células e os parasitos reinvadem (9) e reinfectam fagócitos locais (10). (Adaptada de Kaye & Scott, 2011).

## 2.2. As Leishmanioses

As leishmanioses formam um conjunto de antropozoonoses causadas por diversas espécies de protozoários do gênero *Leishmania,* e são transmitidas por insetos flebotomínios dos gêneros *Lutzomyia* e *Phlebotomus* (De Vries & Schallig, 2022; PAHO/OMS, 2024). Essas doenças são caracterizadas como graves e possuem ciclos de transmissão complexos e de difícil tratamento. As leishmanioses apresentam três manifestações clínicas principais: a leishmaniose cutânea (LC), a leishmaniose mucocutânea (LMC) e a leishmaniose visceral (LV) (PAHO/OMS, 2024). Existe também uma manifestação rara denominada leishmaniose cutânea difusa (LCD).

Segundo a Organização Pan-Americana de Saúde (OPAS), as leishmanioses estão entre as dez principais doenças tropicais negligenciadas, com mais de 12 milhões de pessoas infectadas. Nesse sentido, essas doenças representam um grande problema de saúde pública mundial pois afetam majoritariamente populações socialmente mais vulneráveis, associadas à subnutrição e situações precárias de moradia, bem como a fatores ambientais (PAHO/OMS, 2024).

### 2.2.1. Epidemiologia

A leishmaniose é uma doença com distribuição mundial e é endêmica em 99 países (Torres-guerrero et al., 2017). No Hemisfério Oriental (Velho Mundo) a doença ocorre em partes da Ásia e Oriente Médio, Norte da África e Sul da Europa, e não está presente na Oceania e na Antártida. No Hemisfério Ocidental (Novo Mundo) ocorre principalmente em regiões da América Central e América do Sul (CDC, 2024).

Na América Latina, o Brasil está entre os países onde ocorrem mais de 90% dos casos em todo o mundo (Burza *et al*., 2018; Moraes *et al*., 2023), com 65% dos casos de LC e 89% das infecções por LV (OMS, 2024). Em 2023 foram notificados mais de 13000 casos de LC no país e, dentre as principais DTNs que mais levaram a óbito no período entre 2000 a 2019, as leishmanioses ocupam o 4º lugar, com mais de 6000 mortes causadas por essas doenças (na maior parte dos casos por LV), atingindo faixas etárias entre crianças e jovens adultos (até 19 anos) (Rocha *et al*., 2023). As regiões Norte e a Nordeste são as mais afetadas do país, o que reflete o baixo nível socioeconômico no qual se encontra grande parte dessa população. Nesses locais as limitações no acesso a condições adequadas de saneamento básico e aos serviços de saúde contribuem para a vulnerabilidade frente a essas doenças (Martins-Melo *et al*., 2016; Rocha *et al*., 2023). Nos Estados Unidos, alguns casos já foram reportados no Texas e em Oklahoma. Considera-se que ocorram cerca do dobro de casos dos que são notificados à OMS.

Estima-se que cerca de 600 mil a 1 milhão de novos casos de LC (**Figura 3**) ocorram anualmente em todo o mundo, sendo esta a forma mais comum da doença, enquanto a LV seria a forma de maior potencial de letalidade, somam de 50 mil a 90 mil novos casos por ano no mundo (OPAS, 2024).

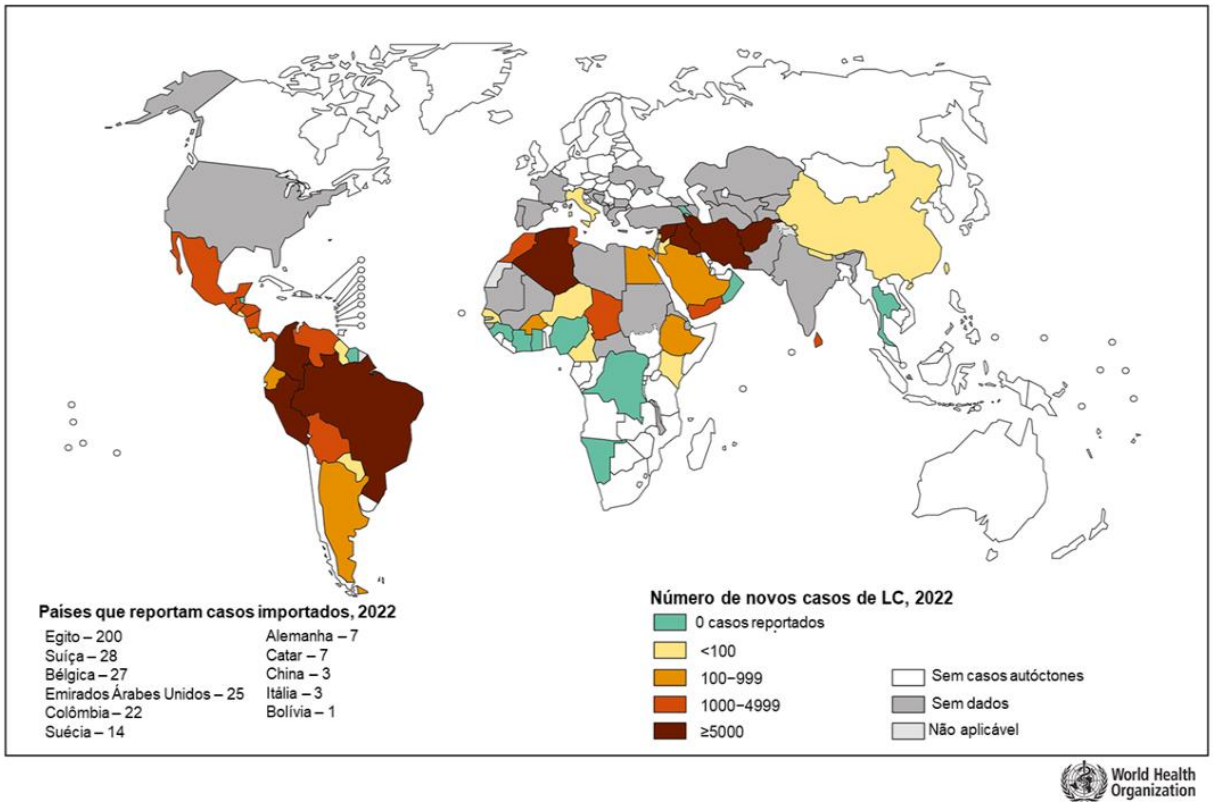



**Figura 3**. Endemicidade global da Leishmaniose Cutânea em 2022. Adaptado de OMS, 2024.

### 2.2.2. Manifestações clínicas das leishmanioses

As leishmanioses são caracterizadas por um espectro de manifestações clínicas que varia devido à complexidade da epizoologia da doença. Isto é, espécies diferentes de *Leishmania* são encontradas também em várias espécies de mamíferos e flebotomínios, apontados como hospedeiros-reservatório e vetores, respectivamente (Reithinger *et al*., 2007). Dessa forma, as diferentes manifestações da doença em humanos dependem da complexa interação entre as espécies de parasito e vetor envolvidas, e a resposta imunológica dos hospedeiros vertebrados à infecção (Freitas-Mesquita *et al*., 2021; Conde *et al*., 2022).

| Principal manifestação da doença | Espécie |
|---|---|
| **Velho mundo, subgênero *Leishmania*** | |
| Leishmaniose visceral | *L. donovani* e *L. infantum* |
| Leishmaniose cutânea | *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* |
| Leishmaniose cutânea difusa | *L. aethiopica* |
| **Novo mundo, subgênero *Leishmania*** | |
| Leishmaniose visceral | *L. infantum* |
| Leishmaniose cutânea | *L. infantum*, *L. mexicana*, *L. pifanol* e *L. amazonensis* |
| Leishmaniose cutânea difusa | *L. mexicana* e *L. amazonensis* |
| **Novo mundo, subgênero *Viannia*** | |
| Leishmaniose cutânea | *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis* e *L. peruviana* |
| Leishamiose mucocutânea | *L. braziliensis* e *L. panamensis* |

**Tabela 1.** As principais espécies de *Leishmania* que afetam humanos. Adaptado de (Kaye & Scott, 2011).

Nas Américas, a *L. amazonensis* é a principal espécie causadora da leishmaniose cutânea (LC) e leishmaniose cutânea difusa (LCD). Na LC (**Figura 4A**), as lesões cutâneas se iniciam como um pequeno eritema isolado onde ocorreu a picada do flebotomíneo, que então evolui para pápula e aumentam até formarem nódulos. Esses nódulos formam úlceras de bordas elevadas e crostas centrais que progridem por um período de 2 semanas a 6 meses (Assouab *et al*., 2024). Estas lesões, a princípio, são indolores, porém, quando ocorrem coinfecções por vírus, bactérias e/ou fungos, podem apresentar lesões simultâneas semelhantes, tornando-se dolorosas e purulentas e dificultando o diagnóstico preciso da doença (De Vries & Schallig, 2022).

**Figura 4. Principais manifestações das leishmanioses**. **(A)** Úlcera localizada no rosto de paciente com leishmaniose cutânea; **(B)** Lesão nasal em paciente com leishmaniose mucocutânea (Burza, 2018); **(C)** Lesões do tipo placas ulcerativas nas pernas de paciente com leishmaniose cutânea difusa (Costa *et al*., 2009);.

A LCD não causa ulceração, mas sim lesões nodulares múltiplas, eritemas e infiltrações difusas progressivas e de aspecto tumoral. A infiltração pode envolver áreas extensas do corpo e na face confere aspecto leonino à aparência do paciente (COSTA *et al*., 2009; PINART *et al*., 2020). A LCD tem recebido cada vez mais atenção uma vez que a gravidade das lesões infiltradas de parasitos reflete a supressão de resposta imune celular do indivíduo, o que caracteriza a ineficiência dos tratamentos *anti*-leishmania disponíveis contra a doença (Burza, 2018; Tegegne & Alemu, 2020).

A LMC é causada por espécies pertencentes ao subgênero *Viannia*, na maior parte dos casos pela espécie *L. braziliensis* e ocasionalmente por *L. panamensis* e *L. guyanensis*. Um dado alarmante dessa forma da doença é que o Brasil juntamente com o Peru e Bolívia compõe cerca de 90% dos casos registrados no mundo (Van Assche *et al*., 2011). Essa forma da leishmaniose provoca lesões metastáticas e progressivas em mucosas do nariz, boca e garganta, podendo ocorrer envolvimento da laringe e orofaringe. Essas lesões podem ser originadas da picada direta do flebotomíneo no nariz ou boca do indivíduo ou surgirem anos após a recuperação de lesões cutâneas mesmo em outras áreas do corpo (Volpedo *et al*., 2021)

Embora a LMC e LCD possuam aspectos clínicos semelhantes, é importante ressaltar que as lesões no tecido mucoso na LCD são muito menos frequentes e são secundárias. Como são causadas por espécies de *Leishmania* distintas, isso implica em diferentes mecanismos

fisiopatogênicos. Parasitos de *L. braziliensis* disseminam-se a partir das infecções cutâneas para tecidos da mucosa através da via linfo-hematogênica sistêmica enquanto *L. amazonensis* provavelmente dissemina-se pela pele por proximidade dos tecidos adjacentes através da via linfo-hematogênica periférica (Silveira, 2019; Volpedo *et al*., 2021).

### 2.2.3. Prevenção e tratamento

Até o momento não existem quimioprofilaxia ou vacinas registradas que ofereçam proteção contra a leishmaniose em humanos. No Brasil, duas vacinas foram desenvolvidas (Leishmune e CaniLeish) que atenuam a infecção por LV em cães (reservatórios de parasitos). Porém, ambas foram suspensas pelo Ministério da Agricultura e Pecuária (MAPA) por não apresentarem eficácia satisfatória nesses animais (Velez & Gállego, 2020). Dessa forma, a principal estratégia de controle da leishmaniose é a detecção e manejo precoce da doença, uma vez que os pacientes não curados contribuem para a permanência do ciclo infectivo do parasito (Burza, 2018). Outra medida preventiva é a redução do contato com o vetor flebotomínio através do uso de repelentes e sprays inseticidas em ambientes onde os insetos possam existir (Kevric *et al*., 2015; Van Griensven & Diro, 2012).

Os tratamentos das leishmanioses compreendem, principalmente, a quimioterapia com antimoniais pentavalentes (**Figura 5**), anfotericina B (AmB) (**Figura 6a**), pentamidina (**Figura 6b**), paromomicina (**Figura 6c**) e miltefosina (**Figura 6d**) (Zhang *et al*.**,** 2025; Talismi *et al*., 2019; Burza *et al*., 2018; Zhang *et al*., 2025). Os complexos de antimônio pentavalente (antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio) são considerados medicamentos de primeira escolha na terapêutica das leishmanioses, e foram introduzidos na década de 1940 (Frézard *et al*., 2009).

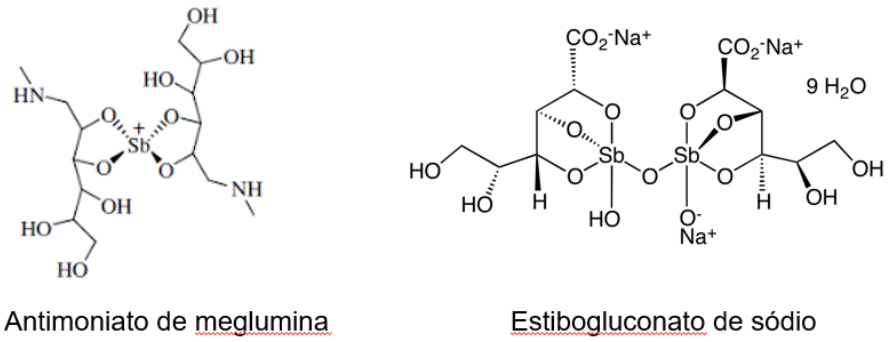



**Figura 5.** Estruturas químicas dos antimoniais pentavalentes utilizados contra as leishmanioses.

A AmB convencional é considerada terapia de segunda escolha para casos resistentes aos antimoniais, sendo utilizada há mais de 60 anos. Devido à baixa tolerância de pacientes e efeitos citotóxicos, foi desenvolvida a forma lipossomal do medicamento, que apresenta maior eficácia com efeitos adversos minimizados, porém, com custo elevado. A pentamidina é outro tratamento alternativo para casos resistentes ou irresponsivos aos antimoniais e possui boa eficácia contra a LC, no entanto, também apresenta efeitos colaterais como nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e risco aumentado a pacientes gestantes. A paromomicina vem sendo descrita como um medicamento parenteral eficaz e de baixo custo e o desenvolvimento da miltefosina, primeiro fármaco oral, foi um grande avanço no tratamento das leishmanioses; contudo, sua principal contraindicação é o efeito teratogênico (Kevric *et al*., 2015; Taslimi *et* al., 2018; Van Griensven & Diro, 2012).

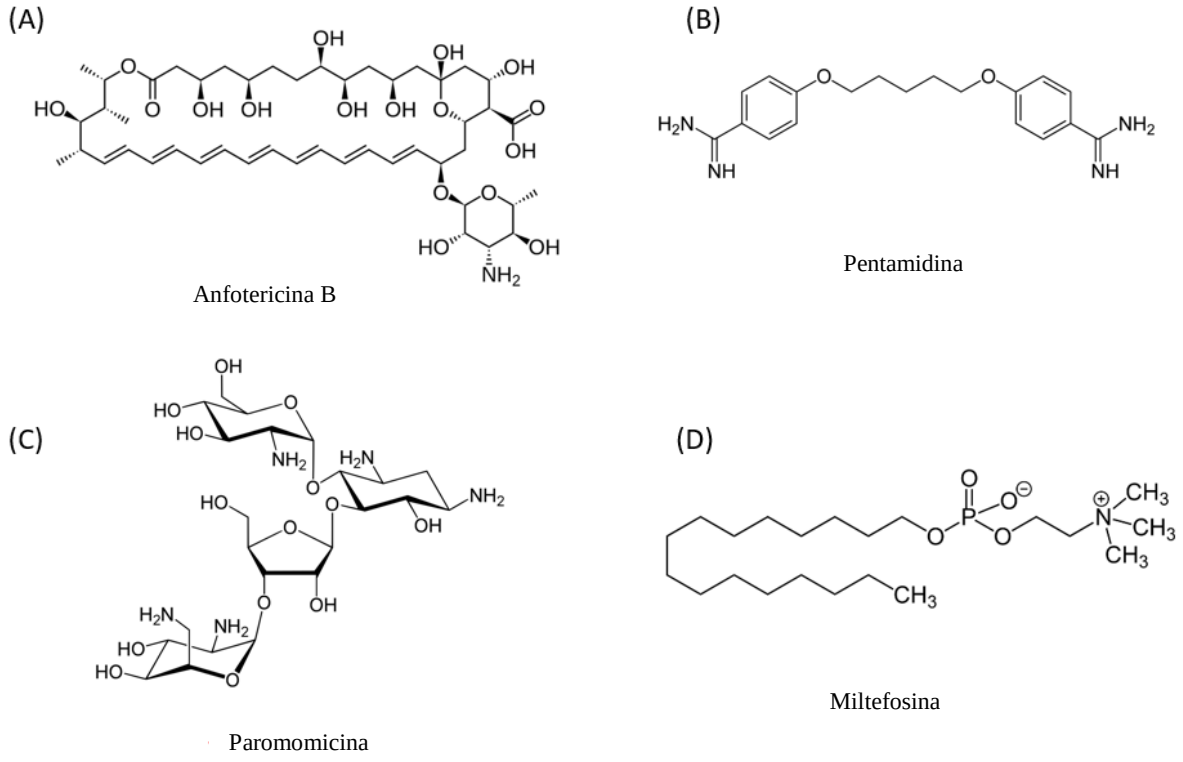



**Figura 6.** Estruturas químicas dos principais medicamentos utilizados contra as leishmanioses.

Os antimoniais atuam sobre enzimas-chave do metabolismo em formas amastigotas do parasito, como a tripanotiona redutase; a miltefosina leva a alterações na biossíntese de fosfolipídeos, resultando em alterações na membrana plasmática e indução de apoptose; a AmB também atua na membrana do parasito, porém ligando-se ao ergosterol, o que leva a formação

de poros e resulta num desequilíbrio osmo-iônico. A paromomicina atua nos ribossomos, afetando a síntese de proteínas nos parasitos, além de comprometer seu metabolismo energético ao prejudicar o potencial de membrana mitocondrial (Taslimi *et al*., 2016; Chakravarty & Sundar, 2019).

Alguns medicamentos antifúngicos da classe dos azóis como o cetoconazol, itraconazol e fluconazol são promissores no tratamento da LC, sendo eficazes contra infecções causadas pelas espécies *L. major* e *L. tropica* (Mathur *et al*., 2021). Estas atividades anti-leishmania já são relatadas há quase 40 anos, exibindo casos com cura total descritos por Berman em 1988 com administração direta de cetoconazol em um período relativamente curto de tratamento e sem reincidência da infecção (Balaña-Fouce *et al*., 1998). Essas substâncias são classificadas como inibidores da biossíntese de ergosteróis (IBEs) e, dessa forma, comprometem a integridade da membrana plasmática de fungos e tripanossomatídeos, uma vez que o ergosterol é um dos componentes de membrana essenciais nestes microrganismos. Os tinidazóis inibem a 14α-demetilação do lanosterol mediada pelo citocromo P450, o que bloqueia a síntese do ergosterol e causa acúmulo de 14α-metilesteróis, levando à morte do parasito (De Macedo-Silva *et al*., 2013, Mathur *et al*., 2021).

Todos os medicamentos contra as leishmanioses apresentam algum desafio significativo para os pacientes: difícil administração (muitas vezes parenteral); custo elevado, requerendo doses diárias por um longo período e de alta toxicidade, associada a efeitos adversos; crescente resistência aos fármacos devido à descontinuidade do tratamento, inviabilizando sua utilização em muitos casos (Bezemer *et al*., 2021; Raimundo *et al*., 2022). Consequentemente, é de extrema importância que haja novos estudos que visem alvos seletivos e um maior entendimento sobre a biologia do parasito, bem como a busca de novas terapias para as leishmanioses.

### 2.3. Espécies Reativas de Oxigênio

O oxigênio molecular ($O_2$) é essencial para a sobrevivência de todos os organismos aeróbios, uma vez que está diretamente envolvido em reações de oxirredução que ocorrem durante o metabolismo energético desses organismos (Thannickal & Fanburg, 2000; Gutteridge *et al*., 2018; Nakai & Daisuke, 2021). Nesse contexto, os processos que reduzem o $O_2$ de forma incompleta para a obtenção energia, também podem formar espécies de maior reatividade, denominadas “Espécies Reativas de Oxigênio” (ROS, do inglês *Reactive Oxygen Species*). Nessa definição estão incluídas uma série de derivados na forma de radicais livres, como o

ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) e o radical hidroxila ($HO^{\bullet}$), bem como algumas espécies não-radicalares como o peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$), sendo essa de maior estabilidade (Buonocore *et al*., 2010; Sies, 2020).

Os radicais derivados do oxigênio representam a mais importante classe de radicais livres gerados nos organismos. Quimicamente, o $O_2$ em seu estado fundamental (oxigênio triplet) possui dois elétrons desemparelhados em sua camada mais externa, sendo assim uma espécie birradical e de comportamento paramagnético. Isto implica que, quando excitados (em geral por processos de fotossensibilização) estes elétrons se emparelham e restringem suas combinações de spin, gerando o intermediário oxigênio singlet ($^1O_2$) (Turrens, 2003; Di Macio *et al*., 2019), estado com uma maior reatividade, capaz de ligar-se com diversas outras espécies químicas (Murotomi *et al*., 2023).

### 2.3.1. Estresse Oxidativo

Os organismos vivos possuem sistemas redox que regulam a produção e eliminação de ROS para que se mantenham em níveis adequados às células, atuando na manutenção e sinalização celular, eliminação de patógenos e diversos outros processos essenciais (Lushchak *et al*., 2014; Zandalinas & Mittler, 2017). Isso implica também que existe uma "janela" que permite que o balanço na produção de ROS seja levemente deslocado no sentido de criar um ambiente oxidante localizado para regular essas funções celulares (Halliwell, 2000; Droge, 2002; Polisak *et al*., 2013; Jolic *et al*., 2017; Sies, 2020). Para isso, os compartimentos celulares possuem uma série de estruturas de defesa antioxidante endógeno que incluem as enzimas superóxido dismutase (SOD), catalase (CTT), glutationa peroxidase (GPx), coenzima Q e moléculas como o tripeptídeo glutationa (GSH), que controlam as concentrações dessas espécies na homeostase redox (Polisak *et al*., 2013; Harris *et al*., 2020). Porém, falhas na produção dessas estruturas ou redução de atividades enzimáticas podem levar à produção excessiva de ROS, tornando-as potencialmente perigosas, uma vez que podem reagir com diferentes biomoléculas celulares, como lipídeos, proteínas e ácidos nucleicos. Esse estado, chamado de "estresse oxidativo" foi definido por Sies em 2007 como "um desequilíbrio entre oxidantes e antioxidantes em favor dos oxidantes, levando a uma interrupção da sinalização e controle redox e/ou dano molecular". Este desequilíbrio pode, inclusive, gerar cascatas de reações radicalares resultando na formação de outras estruturas como os radicais peroxila ($RO_2^{\bullet}$) e alcoxila ($RO^{\bullet}$) (Turrens, 2003). Todo esse processo resulta em modificações estruturais que podem gerar danos celulares irreversíveis para a célula (Sies, 2017).

### 2.3.2. Espécies Reativas de Oxigênio e Sinalização Celular

Por muito tempo assumiu-se a ideia de que as ROS eram uma consequência prejudicial e inevitável da vida aeróbia, principalmente ao se considerar a descoberta da ação de enzimas antioxidantes do organismo (Lambeth, 2004). Porém, tornou-se evidente que estas espécies podem atuar como moléculas de sinalização redox intracelular, capazes de modificar a atividade de enzimas, fatores de transcrição, assim como, regular a expressão gênica, modificações epigenéticas e, dessa forma, controlar a funcionamento celular (Flohé, 2016). O processo de sinalização celular se inicia com a ligação do primeiro mensageiro (ligante) ao seu receptor – uma proteína com estrutura complementar a uma proteína transmembrana ou interna à célula. Isso induz a mudanças conformacionais desse receptor, que por sua vez ativa conjuntos controlados de reações realizadas por intermediários de sinalização ou segundos mensageiros. Assim, no decorrer da via, o sinal recebido é transduzido através de alvos com funções efetoras na célula. Por exemplo, a ativação de diversos receptores de superfície celular como hormônios, citocinas e fatores de crescimento (Averill-Bates, 2024) aumenta os níveis intracelulares de $H_2O_2$ que, em condições fisiológicas, medeiam efeitos subsequentes de maneira semelhante à de um segundo mensageiro (Lenicke *et al.*, 2021; Nair *et al.*, 2019).

### 2.3.3. A Espécie Ânion Radical Superóxido ($O_2^{\bullet-}$)

A redução univalente do $O_2$ a partir de catálise enzimática ou por "vazamentos de elétrons" devido a sequenciais transferências de elétrons (como durante a fosforilação oxidativa na mitocôndria) resulta na formação do ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$). Em solução aquosa, o $O_2^{\bullet-}$ possui uma curta meia-vida e pode sofrer uma dismutação espontânea transformando-se em $H_2O_2$, caso a concentração de sua forma protonada ($HO_2^{\bullet}$) esteja elevada, com uma constante de velocidade igual a $5\times10^5$ $M^{-1}\cdot s^{-1}$. Com a catálise pelas superóxido dismutases (SODs), esse processo se dá cerca de $10^4$ vezes mais rápido, além de garantir que os níveis estacionários de superóxido se mantenham relativamente baixos e a produção de $H_2O_2$ controlada (Thannickal & Fanburg, 2000; Buettner, 2011; Gulcin, 2020).

### 2.3.4. A Espécie Peróxido de Hidrogênio ($H_2O_2$)

O peróxido de hidrogênio ($H_2O_2$), assim como o ânion superóxido, é considerado um metabólito fisiológico intracelular, produzido em diferentes compartimentos durante o metabolismo aeróbico normal em vários organismos. Os elétrons que escapam da cadeia respiratória mitocondrial podem reagir com moléculas de $O_2$ para gerar $O_2^{\bullet-}$, que por sua vez é

convertido em $H_2O_2$ através de catálises promovidas pelas superóxido dismutases (SODs) (Yang *et al*., 2019).

O $H_2O_2$ é a espécie mais estável das ROS, com uma meia-vida cerca de 1000 vezes maior do que o ânion superóxido (Bienert *et al*., 2006). Além disso, nos sistemas biológicos tem uma difusibilidade nas membranas celulares semelhante à $H_2O$, podendo ser facilitada por proteínas específicas como as aquaporinas. Dessa forma, devido às suas características físico-químicas, essa molécula é capaz de atuar como mensageiro para transportar um sinal redox do local de sua geração para um sítio alvo (Sies, 2017). Nesse sentido, um dos mecanismos de maior impacto na regulação redox pelo $H_2O_2$ é a oxidação de resíduos de cisteínas em tiol peroxidases (Sies, 2017).

A disponibilidade de $Fe^{2+}$ livre na célula aumenta o risco de estresse oxidativo devido à reação de Fenton, que a partir do $H_2O_2$ gera o radical hidroxila ($HO^{\bullet}$), espécie altamente reativa que pode levar à danos ao DNA, membrana plasmática e estruturas celulares (Mittler, 2017). Porém, embora as ROS sejam frequentemente relacionadas ao estresse oxidativo, é importante destacar que as células possuem diversos sistemas antioxidantes capazes de manter essas espécies em níveis basais e não-tóxicos. Assim, parte das ROS produzidas podem ser desviadas para reações redox de sinalização (Di Bello *et al*., 2018). Dessa forma, por ser uma das espécies mais estáveis, o $H_2O_2$ aparece em muitos estudos que destacam sua capacidade de transmitir sinais através de uma distância significativamente maior do que as outras, funcionando como uma molécula sinalizadora (Cosentino-Gomes *et al*., 2012).

Como segundo mensageiro, é aceito que o $H_2O_2$ induza a fosforilação da tirosina de proteínas celulares. Estudos mostram que o $H_2O_2$ extracelular às células mimetiza os efeitos de fatores de crescimento ou hormônios e pode levar à hiperfosforilação dos receptores tirosina quinases (Cosentino-Gomes & Meyer-Fernandes, 2012). Portanto, em concentrações baixas específicas o $H_2O_2$ pode atuar como um importante mediador de crescimento celular, senescência, apoptose e diferenciação celular (Di Bello *et al*., 2018).

### 2.3.5. Principais Fontes de Espécies Reativas de Oxigênio

Em organismos aeróbios a mitocôndria é uma das principais fontes de ROS. Isso porque no processo de geração de ATP, na cadeia transportadora de elétrons (CTE), uma pequena parte do $O_2$ consumido é desviado para a formação de ROS, principalmente no complexo I (NADH-ubiquinona oxidorredutase) e no complexo III (ubiquinol–citocromo c oxidorredutase) (Yang *et al*., 2019; Yang *et al*., 2020). No ciclo de Krebs outros complexos enzimáticos também estão envolvidos na geração de ROS, como a α-cetoglutarato desidrogenase (α-KGDH) e a piruvato

desidrogenase. Outra fonte interessante de ROS, especificamente o $H_2O_2$, são as oxidases peroxissomais, que em mamíferos participam de vias como a β-oxidação de ácidos graxos e o catabolismo de poliaminas, com potencial de produção de grandes quantidades dessa espécie (Ferreira *et al*., 2023). O envolvimento de NADPH e NADH na cadeia respiratória e em outras vias do metabolismo celular faz com que ROS sejam produzidas em todos os tipos de células. Assim, outra fonte fundamental de ROS nos organismos são as NADPH oxidases, enzimas com a função principal de geração dessas espécies, envolvidas em diversos processos fisiológicos (Konno *et al*., 2021).

Os tripanossomatídeos possuem somente uma mitocôndria, que é capaz de gerar ROS, apesar das diferenças entre as espécies e estágios de ciclo de vida. Em comparação com os mamíferos, esses microorganismos compartilham sítios geradores de ROS na CTE, embora sejam deficientes em outros (Docampo & Vercesi, 2022). Alguns estudos destacam que essa produção excessiva de ROS pode ser desencadeada por fármacos utilizados clinicamente, como a miltefosina, bem como inibidores clássicos da CTE (Tomás & Castro, 2013).

## 2.4. A Família das NADPH Oxidases

As NADPH oxidases (NOXs) são as únicas enzimas conhecidas com a função específica de produção de ROS (Bedard & Crause, 2007; Reis *et al*., 2020). Trata-se de um grupo de oxidases que catalisam a formação de $O_2^{\bullet-}$ até a subsequente geração de $H_2O_2$ utilizando NADPH como substrato. A catálise se inicia pela doação de elétrons do NADPH para reduzir a flavina $FADH_2$, que então transfere elétrons gradualmente ao heme localizado na subunidade catalítica gp91phox. Consecutivamente, uma molécula de $O_2$ será o aceptor final de elétrons provenientes do heme para gerar $O_2^{\bullet-}$ (**Figura 7**) (Reis *et al*., 2020; García *et al*., 2023).

A primeira NOX foi identificada em 1986 (García *et al*., 2022), localizada em membranas de células fagocíticas que eram capazes de produzir o ânion radical superóxido em resposta à invasão de microorganismos nessas células, causando morte por estresse oxidativo. Esta enzima foi denominada NOX2 (gp91phox) e a elucidação de sua estrutura ao longo do tempo serviu como base para a identificação de outros sistemas enzimáticos semelhantes em células não fagocíticas, como fibroblastos e células do tecido muscular liso (Lambeth *et al*., 2000; Berdad & Crause, 2007; Fukai & Ushio-Fukai, 2020; Zhang *et al.*, 2019).

As NOXs descritas em humanos compreendem sete isoformas – NOX1-5, DUOX1 e DUOX2 (**Figura 7A-B**) – que compartilham seis domínios transmembranares conservados (*N*-terminal), com quatro histidinas de ligação a dois grupos heme conservados, das quais duas estão no terceiro domínio e duas no quinto; e um domínio citosólico (*C*-terminal) específico

para cada isoforma, com subunidades que se ligam ao NADH e ao FAD (Berdad & Crause, 2007; García *et al*., 2023).

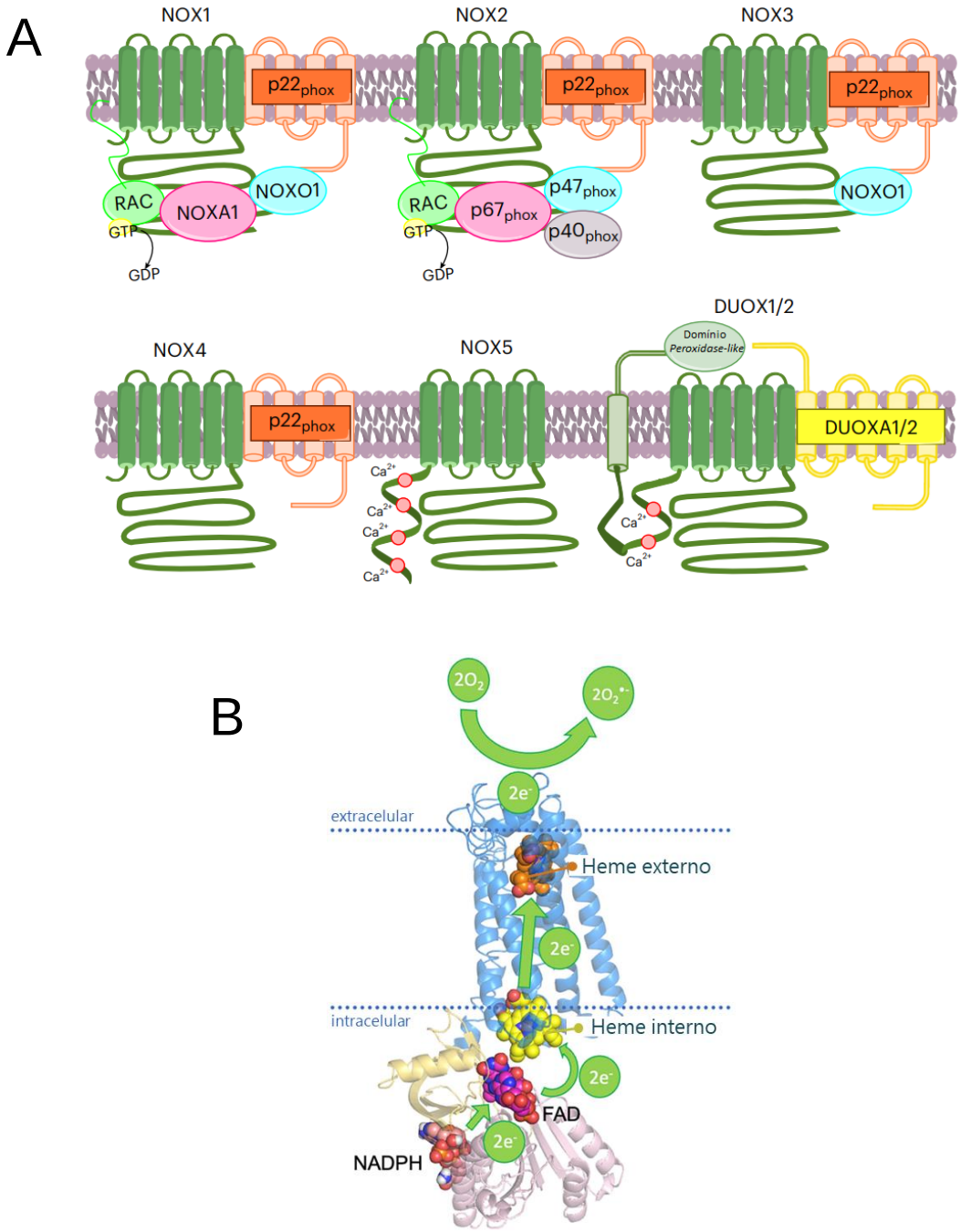



**Figura 7.** Representação das isoformas das NADPH oxidases (NOXs) e suas atividades catalíticas. **(A)** As isoformas das NADPH oxidases e suas subunidades regulatórias (Adaptado de Reis *et al*., 2023). **(B)** Representação esquemática da transferência de elétrons da reação catalítica da NOX1 (tomada como exemplo geral). Os elétrons são doados por um NADPH no domínio de interação do NADPH da NOX. Uma molécula de FAD então aceita os dois elétrons liberados da molécula de NADPH e é reduzida a $FADH_2$ (domínio citosólico; intracelular). Esses elétros são transferidos para os grupos heme, localizados no domínio transmembrana, por meio do qual chegam até a parte extracelular da NOX1. A região extracelular é o local da etapa final da geração de ROS, onde duas moléculas de oxigênio encontram dois elétrons liberados pelo grupo heme externo e são reduzidas à forma de ânion radical superóxido ($O_2^{\bullet-}$) (Adaptado de Liu *et al*., 2023).

A estrutura da NOX2 consiste na subunidade catalítica NOX2/gp91phox ligada à membrana e na pequena subunidade regulatória p22phox, e nas subunidades citosólicas p47phox, p67phox e uma pequena proteína G Rac, responsáveis pela ativação da atividade. As NOX1-3 também requerem ativação através de subunidades, porém com algumas diferenças em relação a NOX2. Estes complexos enzimáticos são formados pela subunidade estabilizadora p22phox, mas também pelo organizador da NADPH oxidase 1 (NOXO1) e o ativador da NADPH oxidase 1 (NOXA1), que são isoformas da p47phox e p67phox, respectivamente. Existem registros de que a NOX3 não necessite da ativação por essas subunidades (Thaylor & Tse 2021; Zhang *et al.*, 2019). A NOX4, diferentemente das outras, requer apenas o centro catalítico nox4 e a subunidade p22phox para sua atividade. Esta enzima é capaz de gerar $O_2^{\bullet-}$ que é rapidamente convertido a $H_2O_2$, como ocorre com as SODs (Nisimoto *et al*., 2014).

A NOX5 tem uma grande diferença em relação às demais pois apresenta um longo domínio de ligação de $Ca^{2+}$ N-terminal (*EF-hands*) (Berdad & Crause, 2007). Essa característica também ocorre nas DUOX1-2, que além dos seis domínios de ligação comuns às outras NOXs apresentam um sétimo domínio transmembrana, contendo um domínio extracelular de homologia da peroxidase (PRX) e fatores de maturação (DUOXA1/2) para sua atividade. Dessa forma, assim como ocorre com a NOX4, as DUOX1-2 geram $H_2O_2$, neste caso de forma dependente de cálcio (García *et al*., 2023).

Como já foi abordado, as NOXs são diferentes de outras enzimas pois sua função exclusiva é a produção de ROS. Os baixos níveis de ROS produzidos por estas enzimas estão associados a processos fisiológicos, incluindo proliferação, migração e diferenciação celular. No entanto, a produção excessiva de ROS, ocasionada por estresse oxidativo e com potencial para resultar em diversos danos celulares, pode ser desencadeada por NOXs (Fukai *et al*., 2020). Numerosos estudos descrevem a participação das isoformas da NOX em modelos de patologias, como em complicações cardiovasculares (Cadenas, 2018; Batty *et al*., 2022), doenças inflamatórias (Taylor & Tse, 2021), metástases pulmonares em melanoma, e complicações da diabetes (Augsburger *et* al., 2019; Fukai *et al*., 2020). Em células de câncer, observa-se aumento dos níveis de ROS oriundos da desregulação ou superexpressão de enzimas NOX, o que se associa com o crescimento anormal dessas células (Lambeth *et* al., 2004). Por isso, essas enzimas tornam-se alvos interessantes para desenvolvimento de novos fármacos que atuem tanto na prevenção como no tratamento dessas doenças (Zhang *et al*., 2020).

### 2.4.1. Inibidores das NADPH Oxidases

As NOXs têm sido estudadas por muitos autores como alvos importantes no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos. Nesse sentido, moléculas inibidoras dessas enzimas são fundamentais para a compreensão dos mecanismos de ação das NOXs, bem como a identificação de suas isoformas. Estas substâncias podem ser moléculas pequenas como o difenilenoiodônio (DPI) (**Figura 8A**) e a apocinina (**Figura 8B**), que se estabeleceram como os principais e mais estudados inibidores de NOXs a partir do ano de 1980, além dos inibidores peptídicos. O DPI é descrito como um inibidor inespecífico de flavoproteínas e, supostamente, interfere em outras oxidases, descrito como inibidor da xantina oxidase (Reis *et al*., 2020) e de proteínas da cadeia transportadora de elétrons na mitocôndria (Buck *et al*., 2012). A apocinina inibe a translocação de membrana de p47phox e p67phox em leucócitos e também é descrita como um inibidor de flavoproteínas. Os inibidores peptídicos replicam sequências de aminoácidos presentes na NOX ou suas subunidades catalíticas e assim bloqueiam a atividade das enzimas (Zhang *et al*., 2020; Cifuentes-Pagano *et al*., 2015).

O inibidor Setanaxib ou GKT137831 (2-(2-clorofenil)-4-(3-(dimetilamino)fenil)-5-metil-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona) (**Figura 8C**) é um inibidor duplo das isoformas NOX1 e NOX4 desenvolvidos pela Genkyotex (Suíça). A OMS introduziu o acrônimo "naxib" para definir a classe de inibidores NOX (do inglês *NADPH oxidase inhibitors*) (Noce et al., 2025). O Setanaxib é um composto *first-in-class*, isto é, pioneiro, que estabeleceu um modelo de pesquisa de outros inibidores competitivos e é o primeiro deles a progredir dos ensaios pré-clínicos até pelo menos a fase II por apresentar segurança, biodisponibilidade e seletividade (Gerussi *et al.*, 2020). Nesse sentido, esse composto é descrito como eficaz no tratamento de nefropatia diabética (Jha *et al*., 2014), colangite biliar primária (CBP) (Jones *et al*., 2023; Invernizzi *et al*., 2023), fibrose hepática (Jiang *et al*., 2012; Aoyama *et al*., 2012; Thannickal *et al*., 2023) e doenças cardiovasculares (Oh *et al*., 2023; Zheng *et al*., 2022).

O composto GKT136901 (2-(2-Clorofenil)-4-metil-5-(piridin-2-ilmetil)-1H-pirazolo[4,3-c]piridina-3,6(2H,5H)-diona) (**Figura 8D**) pertence à mesma classe do Setanaxib e também é descrito como um inibidor com certa seletividade para as isoformas NOX1/4. Essa classe de compostos é a mais bem caracterizada entre os inibidores NOXs, que diante de extensas análises de estudos *in vivo* para diversos efeitos fora do alvo, apresentaram um perfil farmacológico seguro, além de serem biodisponíveis (Laleu *et al*., 2010; Cifuentes-Pagano *et al*., 2015). Esses compostos parecem atuar nas cascatas de sinalização de ROS e, dessa forma, uma série de patologias associadas ao estresse oxidativo ou à produção de ROS NOX-

dependente como diabetes, fibrose, hipertensão e outras doenças pulmonares e cardiovasculares além de doenças neurodegenerativas, podem ser prevenidas ou tratadas por esses inibidores (Page *et al*., 2008).

O inibidor VAS2870 (3-benzil-7-(2-benzoxazolil)tio-1,2,3-triazolo[4,5-d]pirimidina) (**Figura 8E**) faz parte do primeiro grupo de compostos inicialmente identificados como inibidores de NOX2 por triagem de alto rendimento, e foi desenvolvido e patenteado pela farmacêutica Vasopharm. Este composto é classificado como um inibidor pan-NOX, uma vez que demonstrou ser um inibidor de diversas isoformas das NOXs expressas em diversos modelos celulares, dentre os principais, destacam-se os modelos de patologias cerebrovasculares, envolvendo inibição das NOX2/4 (Liu *et al*., 2017) e cardiovasculares, atenuando efeitos NOX-dependentes (ten Freyhaus *et al*., 2006; Boscaro *et al*., 2024). Ressalta-se que, o VAS2870 não é um inibidor geral de flavoenzimas (Dao *et al*., 2019) e que também parece não interagir com ROS de maneira antioxidante (Wind *et al*., 2010).

Estruturalmente, os compostos VAS compartilham um núcleo central de nucleotídeos e, portanto, é possível que esses compostos interajam em domínios de ligação de nucleotídeos, ou seja, NADPH ou FAD (Cifuentes-Pagano *et al*., 2015). Isso pode explicar a falta de especificidade ao inibir as isoformas das NOXs (Cifuentes- Pagano *et al*., 2015; Sun *et al*., 2012). Diante disso, percebeu-se que o VAS2870 parece inibir a atividade da NOX2 quando o complexo enzimático está inativo, ou seja, quando sua estrutura não está totalmente montada (Altenhöfer *et al*., 2015; Barua *et al*., 2019).

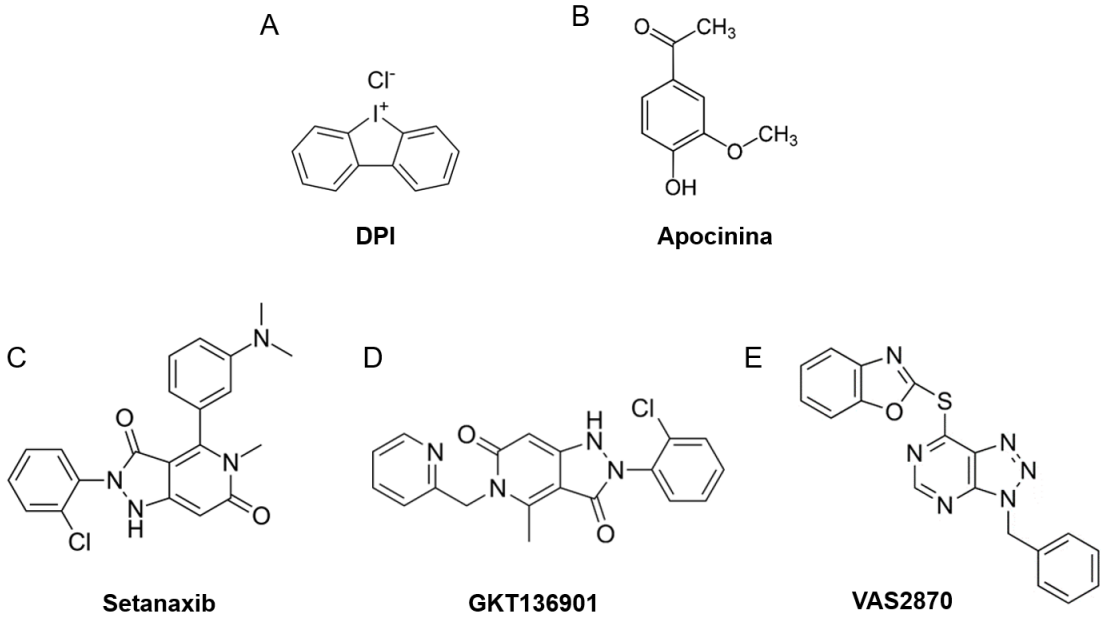



**Figura 8.** Inibidores de NADPH oxidases (NOX).

## 2.5. A Família das Ferro Redutases

As ferro redutases (FRE) são enzimas que transferem os elétrons do NADPH citosólico para íons $Fe^{3+}$ extracelulares para gerar as formas reduzidas $Fe^{2+}$, que podem ser transportados através da membrana plasmática por transportadores de ferro específicos (Zhang *et al*., 2013). Estas enzimas fazem parte de uma superfamília de enzimas que estruturalmente são formadas por seis domínios transmembranares contendo duas histidinas ligadas a heme, um domínio de ligação de FAD e o domínio C-terminal que se liga ao NADH citoplasmático (Sumimoto, 2008).

As NOXs são homólogas às FREs (Zhang *et al*., 2013) e às chamadas ferro-quelato redutases (FROs), que são encontradas em plantas, possuem semelhanças em pelo menos quatro de seus domínios estruturais e, por isso, acredita-se que estas enzimas compartilham um ancestral comum. Porém, as NOXs possuem como aceptor final de elétrons do NADPH o $O_2$, o que gera ROS; enquanto nas ferro redutases, o aceptor final de elétrons é o $Fe^{3+}$ (Sumimoto, 2008).

### 2.5.1. A Ferro redutase de *Leishmania* (LFR1)

O ferro funciona como um cofator essencial para muitas atividades enzimáticas em todos os organismos. Para isso, é necessário estar na forma iônica $Fe^{2+}$, mais solúvel em pH fisiológico do que a forma $Fe^{3+}$, e ao mesmo tempo em concentrações reguladas para que não seja desviado para reações de Fenton e Harber-Weiss, geradoras de ROS e potencialmente danosas ao organismo

Em *Leishmania* pouco se sabia sobre o mecanismo de aquisição e transporte de $Fe^{2+}$, até ser identificada uma proteína que reduz ferro de forma dependente de NADPH em *L. chagasi* (Wilson *et al*., 2002); e mais tarde um transportador de $Fe^{2+}$ da membrana plasmática em *L. amazonensis*. Além disso, foi identificado o gene *LFR1*, que codifica uma proteína de membrana com atividade ferro-redutásica em *L. amazonensis*, a ferro redutase 1 (LFR1), que também ocorre em diversas outras espécies de *Leishmania*. A LFR1 atua em conjunto com o transportador LIT1 (do inglês *Leishmania Iron Transporter 1*), que internalizará o $Fe^{2+}$ gerado pela LFR1 no parasito. Estudos *in silico* apontam que a LFR1 possui onze domínios transmembranares, incluindo um peptídeo sinal *N*-terminal aparente. Existem também dois sítios de ligação de FAD e NADPH na região *C*-terminal citosólica, além de quatro histidinas conservadas, possivelmente ligantes de heme (domínios transmembranares 9 e 11) (**Figura 9**) (Flannery *et al*., 2011).

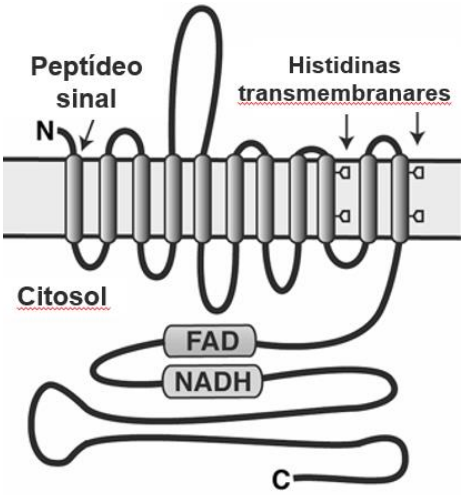



**Figura 9.** Modelo da topologia de membrana prevista da LFR1. Adaptado de Flannery *et al*., 2011.

A atividade ferro-redutásica elevada da LFR1 em formas promastigotas está associada a um ambiente com baixas concentrações de ferro, o que presumivelmente reflete num aumento da expressão da proteína LFR1 nos parasitos (Mittra & Andrews, 2013, Ben-Othman *et al*., 2014). De forma semelhante, o LIT1 só é detectado em formas promastigotas privadas de ferro ou em formas amastigotas intracelulares (Flannery *et al*., 2013). Dessa forma, o mecanismo orquestrado de aquisição de ferro pela *Leishmania*, além de ser essencial para a sua sobrevivência, também está associado com a capacidade do parasito de se diferenciar e de estabelecer infecções (Flannery *et al*., 2011).

### 2.5.2. A atividade NADPH oxidase da LFR1

Em *Leishmania*, nunca foram detectadas sequências clássicas de NOX, porém Rocco-Machado e colaboradores em 2019 descreveram pela primeira vez que a LFR1 de *L. amazonensis* é uma enzima bifuncional, capaz de produzir $H_2O_2$ através de uma atividade NOX quando ativada por heme, caracterizando assim uma nova fonte de produção de ROS em *Leishmania*. Além disso, este trabalho demonstrou que essa enzima está envolvida em processos da diferenciação celular do parasito, em que se observou que a superexpressão de LFR1 estimula a diferenciação do protozoário de suas formas promastigotas para as formas amastigotas infectivas, sem que houvesse alteração de temperatura e pH. Além disso, foi observado que o $H_2O_2$ gerado pela LFR1 ocorria de forma dependente de heme, levando à ativação da $Na^+/K^+$ ATPase (Rocco-Machado *et al*., 2015), uma enzima possivelmente relacionada à diferenciação celular.

Estas informações contribuem para constituir a LFR1 como um possível alvo terapêutico capaz de afetar o ciclo de vida em *Leishmania*. Portanto, neste trabalho a busca por

substâncias que atuem na atividade da LFR1 pode fornecer informações cruciais a respeito do mecanismo de ação dessa enzima e de seu papel fundamental no estabelecimento da infecção gerada por diversas espécies de *Leishmania*, além de ser uma importante ferramenta no desenvolvimento de novos compostos com maior seletividade para a LFR1.

# 3. OBJETIVO GERAL

Avaliar o possível efeito dos inibidores de NOXs, Setanaxib, GKT136901 e VAS2870 nas atividades enzimáticas da LFR1, seu papel na diferenciação e proliferação do parasito.

## 3.1. Objetivos específicos

- Verificar a capacidade modulatória dos compostos Setanaxib e GKT136901 na atividade NADPH oxidase da LFR1 de *L. amazonensis*;
- Verificar a capacidade modulatória do VAS2870 nas atividades ferro-redutase e NADPH oxidase da LFR1 de *L. amazonensis*;
- Determinar os efeitos citotóxicos dos inibidores de NOXs em promastigotas de *L. amazonensis*;
- Verificar interação entre o inibidor com maior potencial citotóxico e a enzima LFR1 através de análise *in silico*;
- Investigar o efeito do inibidor mais promissor na diferenciação e infecção dos parasitos em células fagocíticas.

# 4. MATERIAIS E MÉTODOS

## 4.1. Cultura de Parasitos

Formas promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/75/Josefa) foram cultivadas *in vitro* em meio 199 (Invitrogen), como descrito por Flannery e colaboradores (2011), a 26°C, ajustado para o pH 7,4, suplementado com 40 mM de HEPES, 20% de soro fetal bovino inativado (Crypion), 5% penicilina/estreptomicina, com ou sem 8 μM de heme (cloreto de hemina), 100 μM de adenina e 50 μM de L-glutamina.

Antes dos experimentos os parasitos foram separados do meio de cultura por centrifugação, lavados duas vezes com solução-tampão PBS (do inglês *phosphate buffered saline*) acrescido de 5 mM de glicose, e então estimou-se sua concentração através de contagem utilizando-se uma câmara de Neubauer.

Para o cultivo de formas amastigotas de *L. amazonensis*, os parasitos foram recolhidos no início da fase estacionária (com cerca de 5 a 7 dias de cultivo), onde espera-se que ocorra uma maior concentração de formas promastigotas metacíclicas, e inoculados a 20% do volume total em meio de diferenciação (meio 199 suplementado com 20% de soro fetal bovino inativado, 50 μM de L-glutamina, 5% penicilina/estreptomicina, 10 μM de succinato, com pH 5,5 a 34,5 ºC.

### 4.2. Produção de Peróxido de Hidrogênio

A produção de $H_2O_2$ de células promastigotas intactas de *Leishmania* foi determinada fluorimetricamente por método de oxidação, utilizando a sonda Amplex Red®, na presença de peroxidase de rabanete (HRP). Com o reagente Amplex Red® é possível avaliar a liberação de $H_2O_2$ pelas células sob condições fisiológicas reais (Votyakova e Reynolds, 2004). Foi utilizado um meio de reação (0,2 mL volume final) contendo solução-tampão PBS, glicose 5 mM, Amplex Red® 10 μM e peroxidase de rabanete (HRP) 0,1 U/mL. Concentrações crescentes dos inibidores Setanaxib, GKT136901 e VAS2870 foram adicionadas no início da reação para verificação da capacidade inibitória de cada um por 40 minutos de incubação, conforme indicado nas **figuras 10**, **11** e **12**, e o inibidor inespecífico de flavoproteínas difenileno-iodônio (DPI) foi empregado como controle positivo.

Antes dos experimentos, os promastigotas a 3,0 x $10^9$ parasitos/mL em fase exponencial de crescimento, foram pré-incubados por 20 minutos em condições basais (sem adição da molécula de heme), ou na presença de 2,5 μM de heme, que atua ativando a atividade NADPH oxidase da LFR1. Por fim, a fluorescência emitida pela reação foi monitorada em leitor de microplacas de 96 poços CHAMELEON V (Hidex Oy®, Finlândia) em comprimentos de onda de excitação e emissão de 563 ± 5 nm e 587 ± 5 nm, respectivamente. Os resultados foram expressos por unidades arbitrárias de fluorescência (U.A.).

### 4.3. Teste de Viabilidade Celular de Formas Promastigotas por MTT

Avaliou-se a viabilidade de *L. amazonensis* utilizando o ensaio colorimétrico quantitativo MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio)]. Para os ensaios de MTT, promastigotas em fase exponencial de crescimento (3 dias de cultivo, a 5 x $10^8$ parasitos/mL)

foram incubados em uma placa de 96 poços com meio 199, na presença de diferentes concentrações de VAS2870 como descrito nas legendas das figuras (volume final 0,1 mL), e então o reagente MTT (Sigma, concentração final, 0,50 mg/mL) foi adicionado a cada poço. Após o período de incubação de 3 horas, 100 µL de DMSO foram adicionados para solubilização dos cristais de formazan gerados na reação e a absorbância foi medida através do leitor de microplacas CHAMELEON V (Hidex Oy®, Finlândia) a 415 nm. Para o controle positivo do experimento, os parasitos foram tratados com o fármaco de referência anfotericina B a 1 µM.

### 4.4. Atividade Ferro-redutase da LFR1 de *Leishmania amazonensis*

Promastigotas foram inoculados em meio 199 como descrito em 4.1, porém ausente de heme até fase inicial de crescimento exponencial (2 a 3 dias de crescimento) para estimular atividade ferro-redutásica da LFR1. Os parasitos foram submetidos a um ensaio colorimétrico, utilizando o composto hexacianoferrato de potássio ($K_3Fe(CN)_6$) para avaliação da capacidade de redução do $Fe^{+3}$ para $Fe^{+2}$ como descrito por Rocco-Machado e colaboradores (2019).

O inibidor VAS2870 foi adicionado no início da reação em diferentes concentrações em uma faixa partindo de 1 µM até 20 µM, concomitantemente à suspensão de parasitos ($3{,}0 \times 10^7$ parasitos/mL) em condições basais (sem adição da molécula de heme) ou na presença de heme. Além disso, utilizou-se como controle positivo o inibidor cloreto de difenileno iodônio (DPI). Após 3h de reação, mudanças na absorbância foram monitoradas por espectrofotometria, utilizando comprimento de onda de 420 nm no leitor de placas de 96 poços CHAMELEON V (Hidex Oy®, Finlândia).

### 4.5. Análise *in silico*

Os estudos *in silico* foram realizados em colaboração com o mestre em Química Jorge Lucas F. Lacerda sob supervisão do Prof. Dr. Carlos Maurício Rabello de Sant'Anna, do Instituto de Química da UFRRJ.

O composto (VAS2870) foi otimizado com o método semi-empírico e a função de base PM6 no programa *Spartan'20* (*Wavefunction Inc.*) de modo a ser utilizado na docagem covalente a partir da metodologia definida na literatura (Cambridge Crystallographic Data Centre, 2025).

A estrutura cristalográfica do domínio desidrogenase (DH) da NOX5 da bactéria *Cylindrospermum stagnale* (PDB: 5O0X, resolução: 2,20 Å) obtida por difração de raio X (Magnani *et al.*, 2017) foi obtida no banco de dados RCSB *Protein Data Bank* (PDB) (Flannery *et al.*, 2011).

Devido à ausência de estruturas cristalográficas da LFR1 de *Leishmania amazonensis*, foi necessário construir um modelo para a estrutura tridimensional da proteína. Apesar de haver moldes com nível de identidade mínima necessária com a sequência selecionada domínio da redutase desidrogenase férrica de *L. amazonensis* (código AEG66929.1 no banco de sequências UNIProtKB/Swiss-Prot), como as estruturas 8U85 (NADPH oxidase 5 humana), com 35,88% de identidade, e 7D3F (complexo de oxidase dupla 1 humana), com 30,13% de identidade, a cobertura (31% em ambos os casos) foi insuficiente para modelar toda a proteína, particularmente a região que seria o potencial sítio de ligação do VAS2870, a região C-terminal próxima à flavina do FAD.

Diante disso, foi explorado o método de modelagem *ab initio* por inteligência artificial desenvolvido pelo Google DeepMind e EMBL-EBI (Instituto Europeu de Bioinformática, pertencente ao Laboratório Europeu de Biologia Molecular) para prever a estrutura tridimensional de proteínas sem o uso de moldes, somente a partir de suas sequências de aminoácidos, pelo programa AlphaFold. O AlphaFold utiliza aprendizado profundo para analisar a sequência da proteína e prever sua estrutura 3D. Ele é disponibilizado em servidor *web* alimentado pelo modelo AlphaFold mais recente, o AlphaFold 3 (Abramson, *et al.*, 2024), que apresenta uma arquitetura baseada em difusão substancialmente atualizada em relação aos modelos anteriores, que o torna capaz de prever a estrutura conjunta de complexos, incluindo proteínas, ácidos nucleicos, pequenas moléculas, íons e resíduos modificados.

Para permitir espaço adequado para inserção do inibidor na etapa de docagem molecular, o modelo foi preparado incluindo-se como cofator a molécula de FAD, que é um dos ligantes disponíveis no próprio servidor *web*. Como é esperado que o VAS2870 impeça a interação da LFR1 com o cofator, a molécula de FAD foi removida do sítio durante a docagem molecular.

A preparação do receptor para a docagem covalente no programa *GOLD 2023.2.623* (CCDC *Software* Ltd. Cambridge, *United Kingdom*) foi realizada a partir adição dos hidrogênios de acordo com os estados tautoméricos e de ionização definidos pelo programa. Além disso, o hidrogênio ligado aos resíduos de cisteína alvo (Cys469) foi removido, a fim de possibilitar a ligação covalente com o ligante.

Com o receptor preparado, foi possível iniciar a docagem covalente, para isso, todos os resíduos de aminoácidos foram mantidos rígidos com exceção dos resíduos de fenilalanina (Phe494 e Phe496) próximos, que foram configurados para apresentarem flexibilidade livre, resultando em um melhor acesso do ligante ao alvo. O raio do sítio de ligação foi definido em 10 Å de distância a partir do átomo de enxofre da cisteína alvo (Cys469) do sítio predefinido, baseado nas informações da literatura (Reis *et al.*, 2020), utilizando todas as funções de pontuação disponíveis no programa *GOLD* para a docagem covalente.

As poses geradas pela docagem covalente em cada função de pontuação foram analisadas utilizando o programa de visualização *PyMOL 3.0* da Schrödinger.

### 4.6. Teste de inibição da diferenciação axênica de formas promastigotas para amastigotas pelo inibidor VAS2870

Formas promastigotas no início da fase estacionária (5 ou 6 dias de cultivo) na concentraçãp celular de 5,0 x $10^6$ parasitos/mL foram inoculados em meio de diferenciação em uma placa de 12 poços (volume final de 1 mL/poço) com adição de VAS2870 nas concentrações de 1 µM, 5 µM, 7,5 µM e 10 µM. Os parasitos foram incubados à 34,5 ºC e a cada 24 h alíquotas de 20 µL eram coletadas e tinham densidades celulares estimadas em função do número de formas amastigotas e promastigotas, através de contagens em câmara de Neubauer.

### 4.7. Infecção de macrófagos murinos com *L. amazonensis*

Parasitos foram cultivados meio 199 suplementado como descrito em 4.1 por 5 ou 6 dias, recolhidos da cultura, lavados duas vezes com PBS, ressuspensos em meio RPMI e contados com auxílio de câmara de Neubauer. Para tratamento com 1µM de VAS2870, os parasitos foram mantidos por 15 minutos em estufa à 25°C na presença da molécula previamente à infecção dos macrófagos.

Os macrófagos de linhagem celular (RAW) foram plaqueados sobre lamínulas circulares de vidro ($10^4$ células por lamínula) e mantidos em estufa à 37 °C com atmosfera de 5% de $CO_2$ por 1 h. Em seguida, foram infectados com *L. amazonensis* por 4h (na proporção de 1 macrófago:10 parasitas) em estufa à 35 °C com atmosfera de 5% de $CO_2$. Após esse tempo, os parasitos restantes no sobrenadante foram removidos e adicionou-se novo meio de cultura (RPMI) contento 5% de soro fetal bovino (Cultilab) mantendo-se a infeção por mais 48 h.

Para infecção em macrófagos peritoneais recolhidos de camundongos fêmeas da estirpe BALB/c, os animais foram previamente inoculados com 3 mL de solução de tioglicolato à 3% na região abdominal e após 4 dias procedeu-se o lavado peritoneal com meio RMPI gelado para recolhimento dos macrófagos. Em seguida, os macrófagos recrutados foram centrifugados à 400 g por 5 minutos, ressuspensos em meio RMPI, contados com auxílio de câmara de Neubauer e plaqueados sobre lamínulas de vidro circulares e mantidos em estufa à 37 °C até a realização da infecção. A infecção com *L. amazonensis* foi realizada utilizando-se o mesmo protocolo realizado nos macrófagos de linhagem.

Após as 48h de infecção, as lamínulas foram recolhidas e coradas com Panótico. A partir desta coloração, foi determinado o número de macrófagos infectados e, simultaneamente, o número de parasitas por macrófago, considerando-se um universo de 400 macrófagos totais. O índice de infecção foi determinado a partir da multiplicação da percentagem de macrófagos infectados pelo número de parasitas por macrófago.

### 4.7.1. Considerações éticas

Os procedimentos envolvendo animais foram conduzidos em conformidade com as diretrizes do Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA) e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisas da Universidade Federal do Rio de Janeiro (CEUA-UFRJ: 2019), sob protocolo nº 064/19.

## 4.8. Análise estatística

Os dados foram testados quanto à normalidade inicialmente e apresentados como média ± erro padrão de pelo menos 3 experimentos diferentes e independentes, realizados em triplicatas. Após o teste de normalidade, quando apropriado, os grupos tratados foram comparados ao controle e submetidos aos testes One way ANOVA seguidos de teste Tukey. Foram aplicados também teste-t de Student ou teste de Mann-Whitney. Os critérios de significância estatística estão indicados nas figuras. Os gráficos e os testes estatísticos foram gerados através do *software* GraphPad Prism 8.0 para Windows (GraphPad Software, EUA).

# 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Entende-se que durante o complexo ciclo de vida de *Leishmania*, ocorrem diversas mudanças no ambiente bioquímico ao qual o parasito estará exposto. Além de alterações de pH e temperatura e disponibilidade nutricional, o parasito deverá ser capaz de sobreviver a sistemas de defesa tanto do inseto vetor quanto do hospedeiro mamífero e assim desenvolver estratégias adaptativas para o estabelecimento da infecção. Nesse contexto, torna-se evidente a importância do entendimento dos processos como a proliferação e diferenciação celular de *Leishmania* uma vez que muitas vias moleculares envolvidas ainda não foram bem elucidadas (Mittra *et al*., 2017).

Um dos pontos-chave da sobrevivência de *Leishmania spp*. é sua necessidade de aquisição de ferro extracelular em seu metabolismo. Uma das principais fontes de ferro do parasito é a molécula de heme, cuja síntese não é finalizada em tripanossomatídeos e que poderá ser, então, internalizada pelo parasito através de um receptor de heme ou por um transportador de membrana (LIT, da família ZIP) (Flannery *et al*., 2013). Nesse sentido, foi identificado em *L. amazonensis* o gene LFR1 induzido por baixas concentrações de ferro, que codifica uma ferro-redutase transmembrana dependente de NADPH, responsável pela redução do $Fe^{3+}$ a $Fe^{2+}$ na superfície do parasito. É notável que essa enzima possui estrutura composta por múltiplos domínios transmembranares, uma porção ligada a duas moléculas de heme e a porção citosólica com sítios de ligação FAD e NADPH, onde ocorrerá o início da transferência de elétrons na reação. Essas mesmas porções estão presentes na superfamília de ferro redutases (FREs) fúngicas e em todas as enzimas da família das NOXs nos eucariotos, o que sugere a existência de um ancestral comum entre essas duas classes de enzimas (Sumimoto *et al*., 2008; Caim & Smith, 2021).

As NOXs compreendem um grupo de oxidases cuja função é exclusivamente a produção de ROS e, nos mamíferos, estão presentes em uma série de tecidos. A oxidase gp91phox (NOX2) presente em células fagocíticas foi a primeira NOX caracterizada e é a mais estudada por gerar uma grande quantidade de ROS em resposta a patógenos invasores ou mediadores inflamatórios (Lambeth, 2004). A geração de ROS em nível fisiológico é imprescindível às células por desempenharem uma função essencial na sinalização redox envolvida em respostas biológicas, como proliferação, migração e diferenciação celular, e expressão gênica. Por outro lado, essa família de oxidases vem ganhando atenção por estarem relacionadas a danos oxidativos associados a diversas patologias como doenças cardiovasculares (Fukai *et al*., 2020), diabetes, doenças neurodegenerativas e câncer (Waghela *et al*., 2021). Por isso, estudos a

respeito de uma série de inibidores NOXs vem crescendo, pois estes compostos mostram-se promissores ao atenuar de alguma forma a geração de ROS por essas enzimas (Augsburger *et al*., 2019).

Embora o papel das NOXs em organismos superiores seja bem explorado, existem poucas informações a respeito do funcionamento dessas enzimas em microorganismos. Trabalhos recentes relacionam a importância da produção de ROS em eventos de proliferação e diferenciação em *Leishmania* spp. (Khan *et al*., 2018; Mittra *et al*., 2013) e em 2019, foi descrito pela primeira vez que a LFR1 de *Leishmania* exercia além da atividade ferro-redutásica, uma atividade NOX caracterizada pela geração de $H_2O_2$ regulada por uma determinada concentração de heme (Rocco-Machado et al., 2019). Como uma nova fonte de ROS em *Leishmania*, a LFR1 torna-se um alvo interessante de moléculas que atuem como inibidores de atividade NOX pela enzima, dado o papel essencial dessa função na ativação de processos ligados ao desenvolvimento de formas amastigotas do parasito.

## 5.1. Capacidade inibitória dos compostos Setanaxib, GKT136901 e VAS2870 frente à atividade NOX da LFR1

Inicialmente, neste trabalho, buscou-se investigar se os inibidores de NOXs Setanaxib, GKT136901 e VAS2870 poderiam afetar a atividade NOX da LFR1 de *Leishmania*, representada em função da produção de $H_2O_2$, em presença de concentrações crescentes desses compostos. Para isso, foi utilizando o reagente Amplex Red® (10-acetil-3,7-di-hidroxifenoxazina) que, em presença da peroxidase de rábano HRP (do inglês *Horseradish Peroxidase*), reage com o $H_2O_2$ gerado e forma a substância fluorescente resorufina, o que resulta numa detecção fluorimétrica indireta de $H_2O_2$, mas com alta sensibilidade (Karakuzu *et al*., 2019). Estudos anteriores mostraram que a molécula de heme, essencial para o metabolismo de *Leishmania* e cuja síntese não é possível pelo parasito, gera um aumento na produção de $H_2O_2$. Essa geração dependente de heme foi associada à ativação da atividade NOX da LFR1 (Rocco-Machado *et al*., 2019). Assim, nesse ensaio, parasitos intactos de *L. amazonensis* foram submetidos à condição sem heme (basal) e com heme, a fim de ativar a atividade NOX da enzima. A **Figura 10A** mostra que na presença de concentrações crescentes do inibidor Setanaxib, de 2,5 a 25 µM, há uma inibição dose dependente da atividade NOX dependente de heme. Essa inibição é mais acentuada na concentração de 7,5 µM, e em concentrações maiores do que 15 µM, a atividade NOX foi totalmente abolida. A **Figura 10B** mostra que a inibição causada pelo Setanaxib a 15 µM foi compatível com o efeito do clássico inibidor de

flavoenzimas, difenileneiodônio (DPI), que é capaz de inibir diversas isoformas da NOX, na concentração de 1 µM.

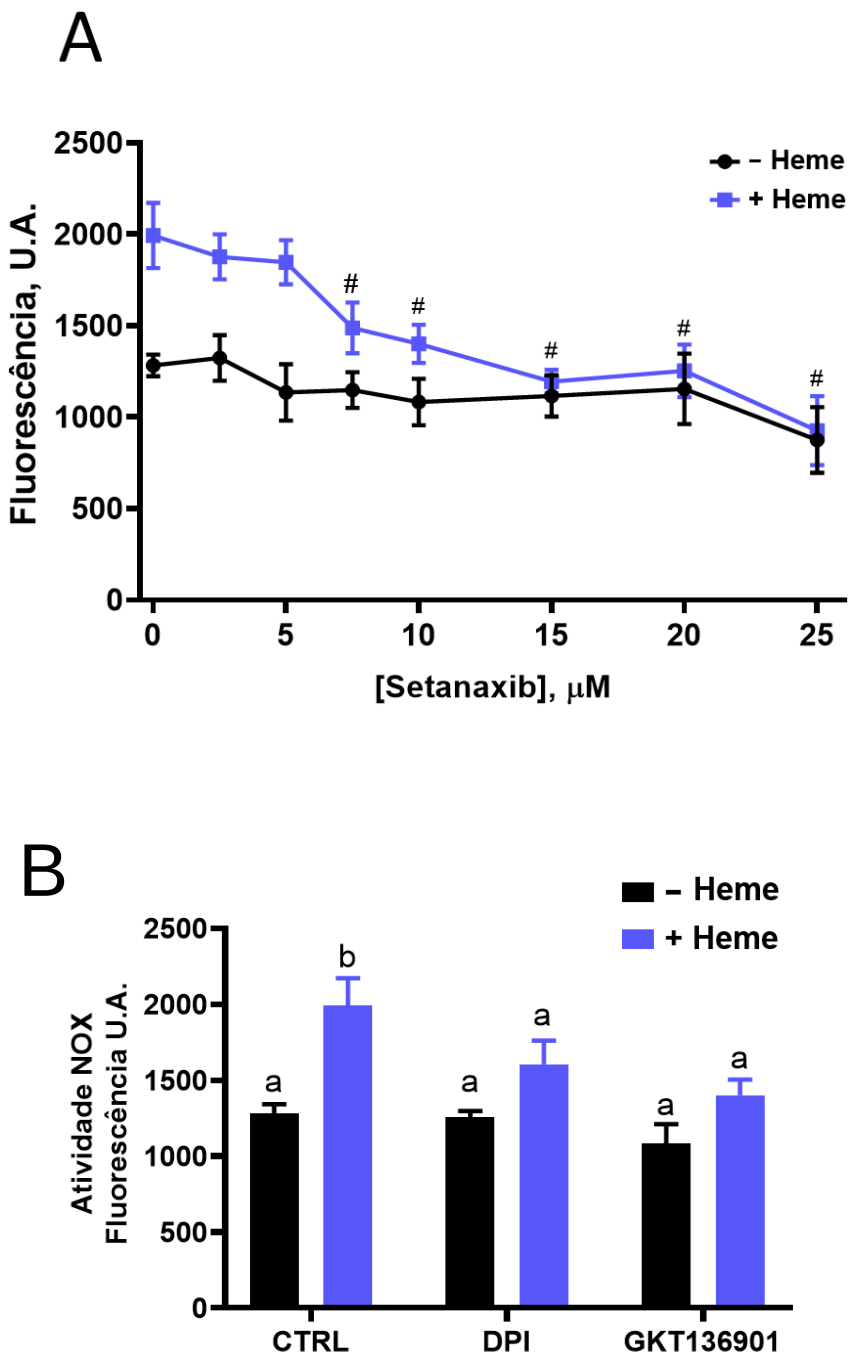
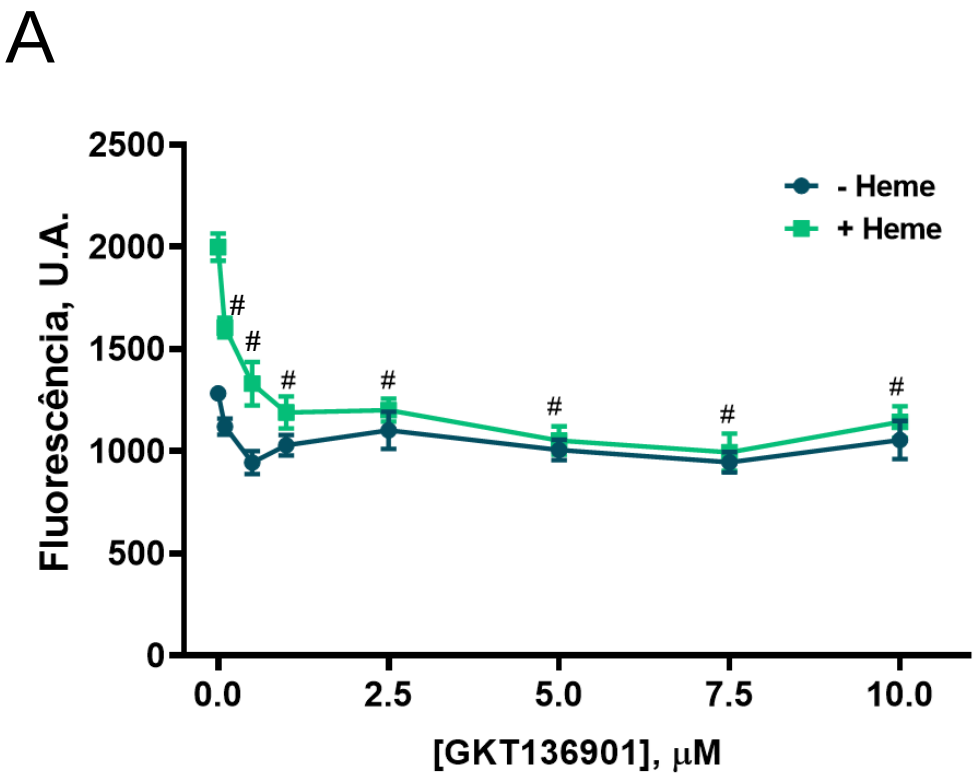



**Figura 10. Atividade NADPH oxidase da LFR1 na presença do inibidor Setanaxib.** Promastigotas intactas de *L. amazonensis* (5 x $10^7$ células/mL) foram incubadas com DMSO 1% (sem heme, atividade basal) ou com heme 2,5 µM (enzima ativada), por 20 minutos. Em seguida, **(A)** concentrações crescentes de Setanaxib, como indicado na figura, e **(B)** 1 µM de DPI e 15 µM de Setanaxib foram adicionadas à reação e a produção de $H_2O_2$ foi mensurada após 40 minutos através do reagente Amplex Red® por emissão de fluorescência. Os valores correspondem à média ± erro padrão de três experimentos independentes em triplicata. O símbolo "#" indica diferença estatística em relação ao controle com heme (enzima ativada), sem inibidor. As letras a e b representam diferença estatística em relação ao controle na presença de heme, sem inibidor. #P < 0,05 conforme avaliado teste t de Student

Um efeito inibitório semelhante foi observado frente a concentrações crescentes do inibidor GKT136901, que foi capaz de modular negativamente a atividade NOX por dependente de heme de forma dose-dependente a partir das baixas concentrações testadas de 0,1 µM, 0,5 µM e 1 µM (**Figura 11A-B**), levando à menor produção de $H_2O_2$, que se manteve em níveis constantes a partir da concentração de 2,5 µM do inibidor. Observa-se que em baixas concentrações do inibidor GKT136901 já existe uma significativa inibição da LFR1 ativada por heme (Figura 11B), como se observa também ao comparar a concentração de 1 µM do inibidor ao controle positivo DPI.



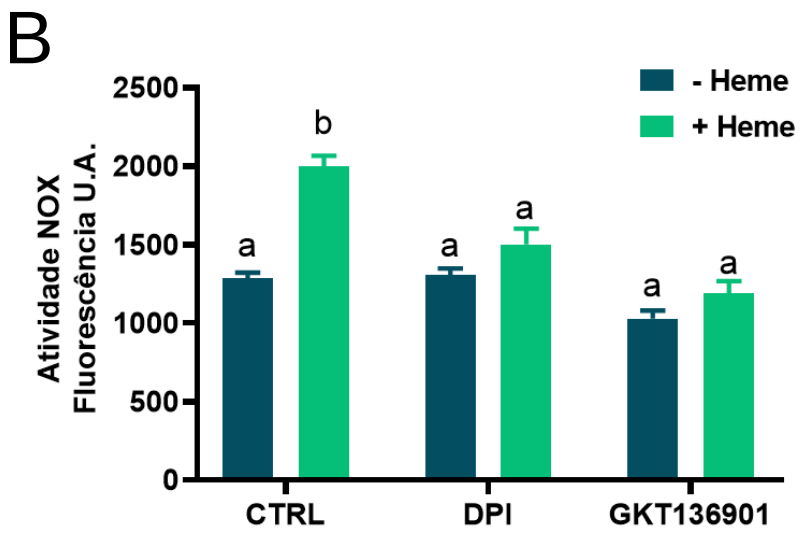



**Figura 11. Atividade NADPH oxidase da LFR1 na presença do inibidor GKT136901.** Promastigotas intactas de *L. amazonensis* (5 x $10^7$ células/mL) foram incubadas com DMSO 1% (sem heme, atividade basal) ou com heme 2,5 µM (enzima ativada), por 20 minutos. Em seguida **(A)** concentrações crescentes de GKT136901, como indicado na figura, e **(B)** 1 µM de DPI e 1 µM de GKT136901 foram adicionados à reação e a produção de $H_2O_2$ foi mensurada após 40 minutos através do reagente Amplex Red® por emissão de fluorescência. Os valores correspondem à média ± erro padrão de três experimentos independentes em triplicata. O símbolo "#" indica diferença estatística em relação ao controle com heme (enzima ativada), sem inibidor. As letras a e b representam diferença estatística em relação ao controle na presença de heme, sem inibidor. #P < 0,05 conforme avaliado teste t de Student

Esses perfis de inibição dos compostos Setanaxib e GKT136901, são consistentes com com o que se observa para as isoformas NOX1 e NOX4, que, inclusive apresentam Ki na faixa de nanomolar (Laleu *et al*., 2010; Augsburger *et al*., 2019; Deliyanti *et al*., 2015). Porém, em modelos *in vivo* em estudos pré-clínicos desses inibidores, muitos autores discutem que o efeito protetor dessas substâncias pode não ser devido à inibição direta de NOXs. Existem também certos desafios na detecção e quantificação das ROS geradas por NOXs, pelo curto tempo de meia-vida dessas espécies no ambiente biológico ou até mesmo a possibilidade do inibidor de interferir nos ensaios (Clos *et al*., 2017; Reis *et al*., 2020). No ensaio de detecção de $H_2O_2$ por Amplex Red, como o realizado neste trabalho, esses compostos parecem inibir a enzima HRP, resultando em uma baixa detecção de $H_2O_2$, indicando uma suposta inibição da NOX (Teixeira *et al*, 2017, Augsburger *et al*., 2019, Dao *et al*., 2019, Reis *et al*., 2020). Efeitos substanciais de ambos os inibidores sobre a sonda Amplex Red® também foram relatados (Reis *et al*., 2020). Portanto, nesse contexto, os inibidores Setanaxib e GKT136901 apresentam limitações que podem induzir a uma interpretação equivocada dos seus resultados de inibição.

Ao avaliar o efeito do inibidor VAS2870, observa-se que a produção de $H_2O_2$ dependente de heme atingiu níveis próximos aos basais (na ausência do heme) partir da menor concentração testada, 0,1 µM. O *inset* detalha que isso ocorre em concentrações submicromolares, o que sugere que esse inibidor exerce um efeito inibitório capaz de abolir a

atividade NOX da LFR1 a partir da concentração de 0,5 µM. Curiosamente, é possível observar uma tendência de aumento da produção de $H_2O_2$ a partir da concentração de 10 µM (**Figura 12A**), além disso, essa inibição também foi comparável ao controle DPI a 1,0 µM. (**Figura 12B**).

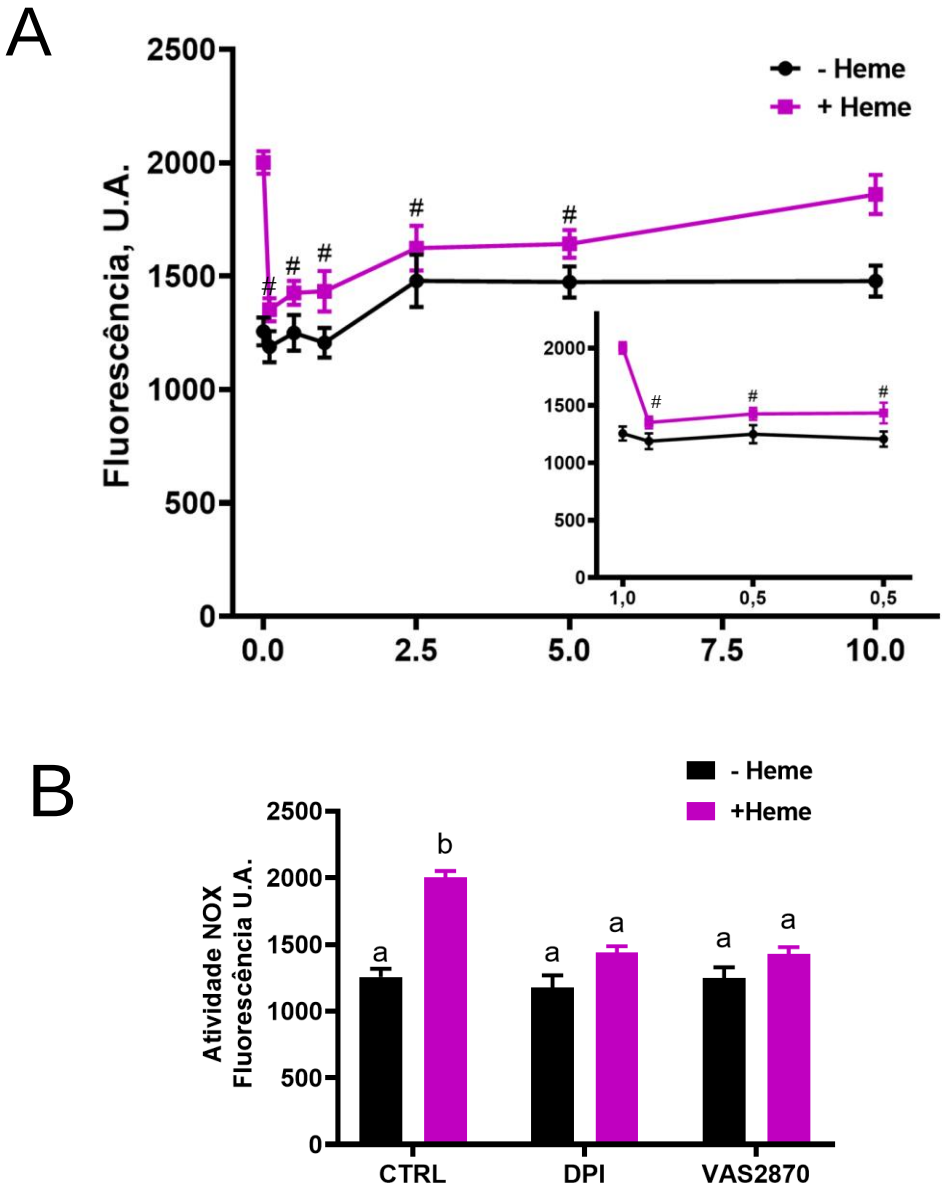



**Figura 12. Atividade NADPH-oxidase de *L. amazonensis* em presença do inibidor VAS2870.** (A) Promastigotas intactas de *L. amazonensis* (5 x $10^7$ células/mL) foram incubadas com DMSO 1% (sem heme, atividade basal) ou com heme 2,5 µM (enzima ativada), por 20 minutos. Em seguida, **(A)** concentrações crescentes de VAS2870 foram adicionadas à reação, como indicado na figura e **(B)** 1 µM de DPI e 1 µM de VAS2870 foram adicionadas à reação e a produção de $H_2O_2$ foi mensurada após 40 minutos através do reagente Amplex Red® por emissão de fluorescência.; o *inset* em **(A)** destaca a capacidade inibitória de VAS2870 frente a atividade NOX da LFR1 em concentrações tão menores quanto 1,0 µM. Os valores correspondem à média ± erro padrão de ao menos três experimentos independentes em triplicata. O símbolo "#" indica diferença estatística em relação ao controle com heme (enzima ativada), sem inibidor. As letras a e b representam diferença estatística em relação ao controle na presença de heme, sem inibidor. #P < 0,05 conforme avaliado teste t de Student.

Os resultados descritos anteriormente podem ser comparados pela literatura que mostram o VAS2870 sendo efetivo na inibição da enzima NOX2, quando avaliada sua capacidade inibitória frente à NOX2 de células intactas de HL-60 (linhagem celular de leucemia humana) ($IC_{50}$=1-2 µM), bem como em membranas isoladas de neutrófilos humanos, contendo NOX2 e suas subunidades necessárias (IC50 = 10 µM) (Gatto *et al*., 2013; Augsburger *et al*., 2017; Dao *et* al., 2020). O VAS2870 demonstrou boa capacidade inibitória frente a NOXs de membranas isoladas de células HEK293 F (linhagem de células renais embrionárias humanas) e células PLB-985 (derivadas da linhagem HL-60), que foi medida por meio do ensaio de AmplexRed®, resultando nas $IC_{50}$ = 73,6 ± 3,7 µM para NOX1, $IC_{50}$ = 12,3 ± 2,1 µM para a NOX4 e $IC_{50}$ = 1,8 ± 0,1 µM para a NOX5 (Noce *et al*., 2025). Embora não existam dados que relacionem a ação do inibidor VAS2870 em microorganismos, esses resultados sugerem que esse composto possa ser eficaz em inibir a LFR1, e de uma maneira semelhante à inibição observada para enzimas NOXs.

Descreve-se que seu modo de ação inibitória se dá através da tioalquilação de resíduos de cisteína presentes no sítio catalítico das NOXs (Augsburger *et al*., 2019; Reis *et al*., 2025). Esse mecanismo já foi descrito em modelo de células do tecido muscular liso em mamíferos, em que o VAS2870 foi capaz de modificar tióis do receptor rianodina (RyR1) no canal de $Ca^{+2}$, observados em vesículas do retículo sarcoplasmático dessas células, isoladas em tampão livre do efeito antioxidante da glutationa (GSH). Nesse modelo celular, que caracterizou a expressão da NOX4, o VAS2870 também apresentou inibição da geração de ROS acoplada a regulação do receptor RyR1, sendo um potencial efeito não direcionado desse inibidor (Sun *et al*., 2012).

## 5.2. Efeito citotóxico dos inibidores Setanaxib, GKT136901 e VAS2870 frente a *L. amazonensis*

Uma vez que o Setanaxib e GKT136901 são descritos como inibidores eficazes de NOX1/4 (Schildknecht *et al*., 2014, Teixeira *et al*., 2017), e o VAS2870 inibidor seletivo de NOXs em diversos modelos celulares (Altenhöfer *et al*., 2012) e diante dos efeitos observados na enzima LFR1 neste trabalho, tornou-se interessante investigar se existe também um efeito desses compostos sobre a sobrevivência de *Leishmania amazonensis.* Para isso, foram realizados ensaios de viabilidade celular por MTT em períodos de 24 h e 72 h na presença de concentrações crescentes dos inibidores e, como controle positivo, foi adicionado o fármaco de

referência anfotericina B, na concentração de 1 µM e representados em porcentagem de parasitos viáveis, como mostra a **Figura 13**.

O resultado mostrado na **Figura 13A** mostra que o Setanaxib não apresentou efeito citotóxico frente as formas promastigotas no período de 24h nas concentrações testadas. Já no período de 72h (**Figura 13B**), nas concentrações de 1 µM e 5 µM o inibidor reduziu a viabilidade celular dos parasitos de forma branda, em cerca de 28% e em 33,6%, quando presente na concentração de 10 µM. O inibidor GKT136901 não demonstrou efeito tóxico frente as promastigotas significativo em nenhuma concentração nos dois períodos testados (**Figura 13C-D**). O inibidor VAS2870 mostrou-se levemente tóxico aos parasitos no período de 24 h, reduzindo a viabilidade em cerca de 25% e 28% nas concentrações de 10 µM e 20 µM respectivamente (**Figura 13-E**) e, no período de 72 h, o efeito tóxico foi expressivo e reduziu a viabilidade em cerca de 70% e 90% nas mesmas concentrações (**Figura 13-F**), mostrando a necessidade de um maior tempo de contato do VAS2870 com os parasitos para que haja efeito tóxico.

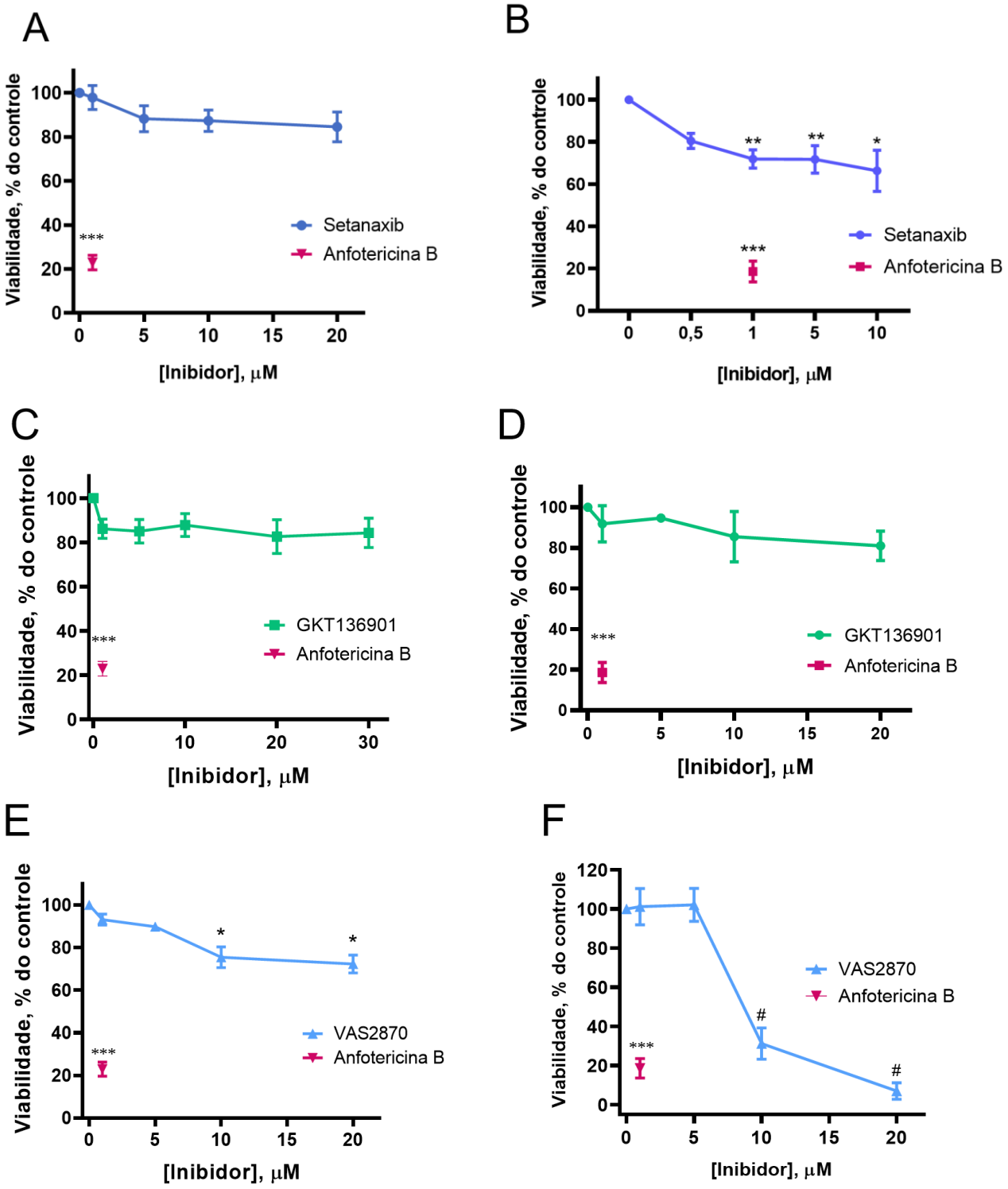



**Figura 13. Efeito citotóxico dos inibidores Setanaxib, GKT136901 e VAS2870 frente *L. amazonensis*.** 5 x $10^6$ promastigotas em fase logarítmica de crescimento foram adicionadas em placas de 96 poços contendo concentrações crescentes de Setanaxib (0,5 µM, 1 µM, 5 µM, 10 µM e 20 µM), GKT136901 (1 µM, 5 µM, 10 µM, 20 µM e/ou 30 µM) e VAS2870 (1 µM, 5 µM, 10 µM e 20 µM). Os parasitos foram incubados a 26 °C por 24 h (A, C e E) e 72 h (B, D e F). Após estes períodos, foi adicionada uma solução de MTT (5 mg/mL) a cada poço, seguindo incubação a 26 °C por 3 h. Parasitos-controle, apenas na presença do veículo (DMSO), foram considerados como 100% viáveis. Os valores correspondem à média ± erro padrão de três experimentos independentes em triplicata. ***$P$<0,001, *$P$ < 0,05 e #$P$ < 0,005 indicam diferença estatística em relação ao controle sem inibidor (DMSO), conforme avaliado pelo teste-T de Student em relação ao controle, seguido pelo pós-teste Mann-Whitney.

O Setanaxib é utilizando em diversos modelos de patologias associadas à ROS oriundas das NOX1/4. Em modelos animais, o Setanaxib é capaz de inibir a progressão tumoral mediadas por moléculas sinalizadoras como VEGF e MAPK, relacionada à liberação de ROS pela NOX4 (Tang *et al*., 2018). Em modelo de células de leucemia mieloide aguda, um grupo descreveu que o Setanaxib demonstrou atividade anti-proliferativa contra essas células e atenuou o desenvolvimento da doença em modelo murino, além de aumentar o efeito citotóxico de antraciclinas, quimioterápicos utilizados o tratamento de diversos cânceres. Porém, o estudo mostrou que estes efeitos não dependem da inibição da NOX4 da subunidade funcional comum NOX1-4 p22-phox, indicando outros mecanismos não-enzimáticos (Demircan *et al*., 2022).

O Setanaxib é o primeiro inibidor a evoluir dos ensaios pré-clínicos para o desenvolvimento das posteriores fases clínicas (Thannickal *et al*., 2023) e é um composto caracterizado por exibir propriedades adequadas para a utilização *in vivo* e também exibem perfis de ADME favoráveis, bem como o seu análogo GKT136901 (Altenhöfer *et al.*, 2015). Portanto o comportamento de inibidores dessa classe pode ser esperado, pois não apresentam efeito citotóxico pronunciado em outros modelos experimentais.

O VAS2870 já foi descrito como um inibidor com certa toxicidade em baixas concentrações devido a possíveis efeitos derivados da alquilação de tióis em outras estruturas celulares (Augsburger *et al*., 2019; Noce *et al*., 2025). Como foi observado no resultado mostrado na **Figura 12A**, a partir da concentração de 10 µM o VAS2870 parece aumentar a geração de $H_2O_2$ de uma forma independente da atividade da LFR1. Isso leva à especulação de que a partir dessa concentração a geração de ROS pode estar ligada aos efeitos tóxicos causados pelo inibidor aos parasitos de *L. amazonensis* mostrados na figura **Figura 13E-F**.

### 5.3. Efeito do VAS2870 na atividade ferro-redutase da LFR1

Até este ponto, o inibidor VAS2870 mostrou-se promissor diante da inibição da atividade NOX da LFR1 somada ao efeito na sobrevivência do parasito. Por isso, o passo seguinte foi avaliar a atividade ferro-redutásica da enzima em presença desse inibidor para demonstrar os possíveis efeitos desencadeados pela substância. Para isso, uma vez que é bem descrito que a atividade das redutases são induzidas pela carência de ferro (Flannery *et al*., 2011; Bem-Othmann *et al*., 2013), promastigotas de *L. amazonensis* foram cultivados por cerca de 16 h em meio sem hemina, principal fonte de ferro em *Leishmania*, antes de serem submetidos ao ensaio. Nesta condição, concentrações crescentes do inibidor VAS2870 foram adicionadas, além de 1 µM do inibidor DPI como controle negativo. A atividade ferro-redutase

da LFR1 foi então avaliada conforme a capacidade dos parasitos de reduzir o composto hexacianoferrato de potássio ($K_3Fe(CN)_6$), impermeável às células, substrato da enzima.

O resultado mostrado na **Figura 14A** demonstra que o VAS2870 nas concentrações de 5 µM e 10 µM causou diminuição significativa da atividade ferro-redutásica. Entretanto, na concentração de 1 µM o inibidor exibiu uma atividade ferro-redutásica comparável ao controle, ou seja, não apresentou inibição. Além disso, como já esperado, nota-se que o DPI, utilizado como controle negativo, foi capaz de inibir a atividade ferro-redutásica da LFR1 na concentração utilizada (**Figura 14B**).

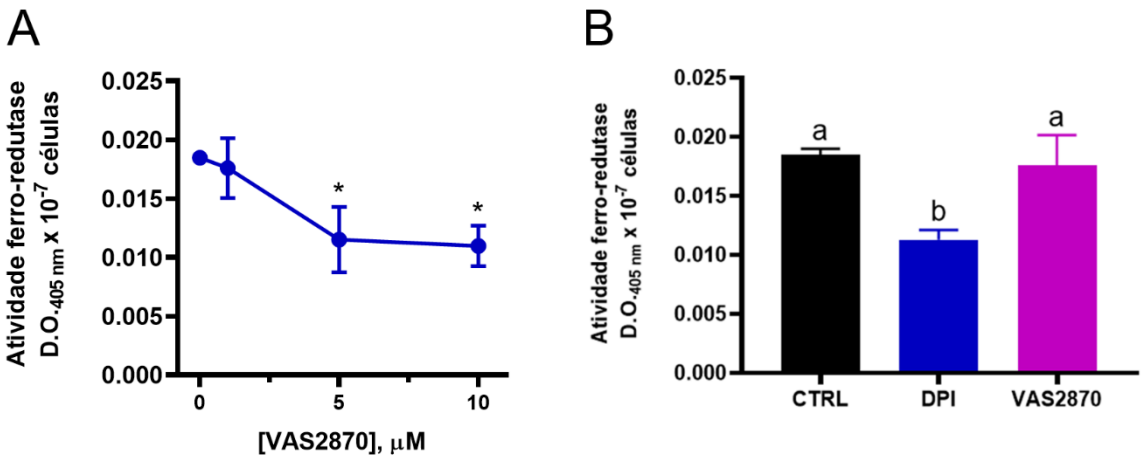



**Figura 14. Efeito do VAS2870 na atividade ferro-redutásica da LFR1. (A)** Promastigotas de *L. amazonensis* intactas (MHOM/BR/75/Josefa) ($1x10^9$ células/mL) foram incubadas com VAS2870 nas concentrações de 1 µM, 5 µM e 10 µM ou **(B)** DPI 1 µM como indicado na figura. Após 20 minutos, os parasitos foram centrifugados e ressuspensos em tampão HBSS contendo 1 mM de hexacianoferrato de potássio por 3 horas. Após isso a atividade ferro-redutásica foi monitorada espectrofotometricamente, em um comprimento de onda de 415 nm. Os valores correspondem à média ± erro padrão de ao menos três experimentos independentes em triplicata. As letras "a" e "b" acima das barras indicam diferenças estatísticas ($P < 0,05$), conforme avaliado pela ANOVA, seguido pelo teste de comparação múltipla de Tukey. *$P < 0,02$, conforme avaliado por Test-T de Student.

Diante dos resultados obtidos para a atividade NOX da LFR1, em que o VAS2870 foi capaz de inibir a enzima na concentração de 1 µM, o fato dessa mesma concentração do inibidor não ter exercido nenhum efeito sob a atividade ferro-redutásica pode indicar uma possível modulação da enzima nessas condições. Além disso, para comparar a inibição do VAS2870 a partir de um controle positivo, o inibidor geral de flavoenzimas DPI mostrou-se capaz de inibir tanto a atividade ferro-redutásica da enzima quanto a atividade NOX, como mostrado anteriormente (**Figura 12B**). Sabe-se que a LFR1 exerce sua atividade catalítica utilizando o NADPH citosólico como fonte de elétrons, que através do FAD e grupos heme na bicamada

lipídica da membrana do parasito, reduzem o $Fe^{3+}$ a $Fe^{2+}$ (Flannery *et al*., 2013). Como já mencionado, a atividade NOX também realizada pela enzima ocorre pelo mesmo mecanismo porém reduzindo o $O_2$ extracelular e gerando $H_2O_2$. Ainda assim, é importante ressaltar que ambas as atividades da LFR1 ocorrem em diferentes condições de cultivo do parasito uma vez que a incubação com 2,5 µM de heme é capaz de aumentar a produção de $H_2O_2$ (ativar a atividade NOX) e inibir a atividade ferro-redutásica. Isso indica a possibilidade de haver uma competição entre os aceptores finais de elétrons da enzima ($Fe^{3+}$ ou $O_2$) pelos elétrons provenientes do NADPH, como afirmou Rocco-Machado e colaboradores (Rocco-Machado *et al*., 2019). Por isso, é importante considerar que mesmo que o DPI seja capaz de inibir ambas as atividades como foi observado, é possível que fatores regulatórios possam estar envolvidos no funcionamento das atividades descritas para a LFR1, o que pode refletir no modo de inibição dessas atividades pelo VAS2870 na concentração de 1 µM.

O DPI é um potente inibidor de NOXs e de outras flavoenzimas como a xantina oxidase, CYP450 redutase e NO sintase. Diante disso, esse composto é um inibidor de referência para diversos ensaios de inibição de NOXs *in vitro*. Porém, sua falta de especificidade, e elevada toxicidade *in vivo* relatadas tornam seu uso inadequado como um medicamento (Cross & Jones, 1986; Augsburger et al., 2019; Kuai *et al*., 2020). Nas NOXs, o DPI se liga covalentemente ao cofator FAD presente no domínio citosólico da enzima, após sua redução pelo NADPH. Além disso, essa inibição se dá pela formação de um aduto entre o DPI e os hemes localizados no domínio transmembrana da NOX (Augsburger *et al*., 2019; Reis *et al*., 2020). Diante disso, os resultados anteriores indicam que o VAS2870 em concentrações menores que 1 µM pode apresentar seletividade ao inibir apenas a atividade NOX da LFR1, enquanto o inibidor DPI a 1 µM inibe ambas as atividades dessa enzima.

O VAS2870 é descrito como um inibidor pan-nox por inibir mais de uma isoforma da NOX, sendo eficaz frente às NOX1, NOX2, NOX4 e NOX5 (Wigler *et al*., 2017), o que sugere que o modo de ação desse composto se dê por fatores em comum entre as isoformas (Augsburger *et al*., 2019). No entanto, para NOX2 que gera ROS a partir da ativação de subunidades citosólicas, o VAS2870 é eficaz somente antes da montagem do complexo enzimático ativo e não após a enzima já estar ativada (Altenhöfer *et al*., 2012). Em modelo de células neuronais humanas (SH-SY5Y), o VAS2870 exibiu um efeito protetor ao inibir a translocação da subunidade p47phox, o que impede a exposição dos outros domínios da enzima e consequentemente a aproximação das outras subunidades necessárias à atividade da enzima (Li *et al*., 2017).

Considerando a capacidade inibitória do VAS2870 em baixas concentrações e seu efeito tóxico em promastigotas, esse inibidor foi o selecionado para dar continuidade aos estudos *in silico* de docagem molecular e aos estudos de infecção *in vitro* com macrófagos murinos.

### 5.4. Análise *in silico*

Para corroborar o efeito inibitório do VAS2870 na LFR1 de *L. amazonensis*, observado anteriormente, ensaios *in silico* foram conduzidos a fim de explorar o possível mecanismo de interação dessa molécula com a enzima.

É importante ressaltar que a LFR1 como uma ferro redutase que também exerce atividade NOX levantou indícios de que essa enzima seja resultado de uma relação evolutiva entre a família das NOXs e a família das ferro redutases (FRE). Além disso, a presença dos domínios transmembranares conservados contendo heme e de domínios citosólicos C-terminais para o FAD e NADPH compartilhados entre as duas famílias classificam-nas como homólogas (Sumimoto, 2008; Zhang *et al*., 2013). A LFR1 pode ter feito parte de estágios iniciais da evolução de eucariotos, onde ocorreu a mudança de função das metaloredutases para NOX geradoras de ROS, inicialmente associadas também à regulação por domínios de íons $Ca^{2+}$ (EF-*hand*) (Zhang *et al*., 2013; Massary *et al*., 2022). A LFR1 compartilha padrões de consenso entre FRE de plantas e fungos e entre a NOX5 e, embora não tenham sido encontrados domínios *EF-hand* em sua estrutura, há indícios de que suas atividades podem ser reguladas por $Ca^{2+}$ como ocorre com a NOX5 (Flannery *et al*., 2011; Zhang *et al*., 2013; Rocco-Machado *et al*., 2019). Com base nessas evidências, os estudos a seguir foram conduzidos a fim de identificar os mecanismos envolvidos nas atividades da LFR1 a partir da interação do inibidor VAS2870 com a enzima.

Em 2020, Reis e colaboradores mostraram que o VAS2870 se liga covalentemente à enzima NOX5 através de um sítio no domínio desidrogenase (DH) da enzima. Esse domínio (resíduos 413 a 693) é definido como uma região C-terminal que contém o cofator FAD, e o sítio de ligação do NADPH e foi caracterizado a partir de modelos da NOX5 recombinante da cianobactéria *Cylindrospermum stagnale* (csNOX5). Neste estudo foi identificada um resíduo de cisteína (Cys668) conservado localizado no sítio ativo do domínio DH como o principal alvo para a interação com o VAS2870. Assim, mostrou-se que ocorre uma tioalquilação pelo grupo benzil-triazolopirimidina (derivado do VAS2870) na cisteína, caracterizando uma modificação direta no sítio ativo da enzima que impedirá a interação do NADPH, bloqueando a transferência

de elétrons para o FAD e consequentemente impedindo a formação de ROS (**Figura 15**) (Reis *et al*., 2020).

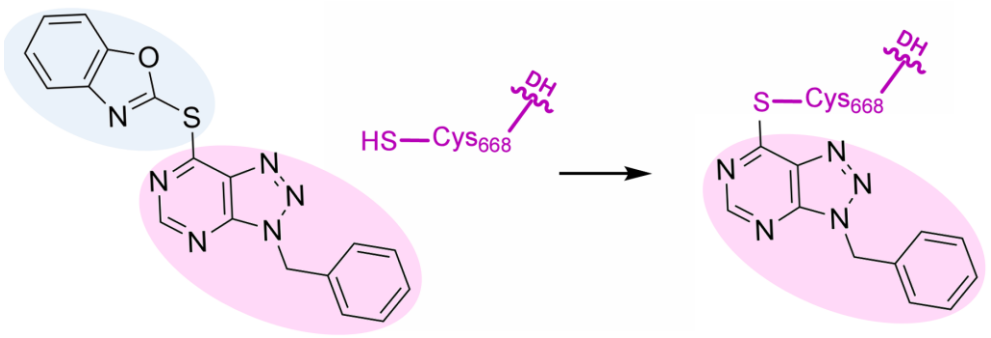



**Figura 15. Estrutura do aduto VAS2870-cisteína no domínio DH da csNOX5.** A porção mercaptobenzoxazol está destacada em azul e a porção benzil-triazolopirimidina em rosa. Uma representação simplificada do domínio desidrogenase (DH) da csNOX5 está na cor violeta. Adaptado de Noce *et al*., 2025.

Assim, a partir desse conhecimento prévio, a modelagem molecular do derivado do VAS2870 foi realizada, seguindo a metodologia de docagem covalente anteriormente descrita (Cambridge Crystallographic Data Centre, 2025), resultando na preparação do ligante otimizado.

Dessa forma, o modelo torna viável a comparação tridimensional entre os resíduos de aminoácidos necessários para a interação do ligante (nesse caso o inibidor VAS2870) com o sítio de ligação do FAD. Nesse trabalho foi descrito que o resíduo Cys668 é o principal local de interação do inibidor com o FAD, além de uma fenilalanina (Phe693) responsável por ser uma chave seletora do sítio que afeta diretamente a interação com o NADPH (Magnani *et al*., 2017).

A abordagem adotada a seguir, considera a modelagem *ab initio*, que é realizada para a obtenção de um modelo computacional do DH da LFR1 de *L. amazonensis*, já que essa enzima não possui sua estrutura cristalográfica resolvida. A partir desses resultados, será possível observar se o VAS2870 age pelo mesmo mecanismo nesta enzima. Utilizando o programa Alphafold 3, o modelo DH da LFR1 foi produzido e alinhado à estrutura cristalográfica do domínio DH da csNOX5 (PDB:5O0X) para que fosse possível validar o modelo homólogo e prosseguir com a docagem molecular.

O alinhamento realizado no *PyMOL 3.0* da *Schrödinger* apresentou uma resolução de 1,051 Å de RMSD (do inglês "*Root Mean Square Deviation*"). O RMSD é o desvio médio quadrático entre os átomos equivalentes e é uma medida que leva em conta o grau de

similaridade entre duas estruturas de proteína sobrepostas. Nesse caso, o resultado obtido reflete um ótimo alinhamento e alta identidade estrutural em relação ao modelo do PDB utilizado como referência. Além disso, foi possível identificar os resíduos de aminoácidos Cys668, Phe693 e a Trp695 do domínio DH da csNOX5, e seus equivalentes da LFR1, identificados respectivamente, pelos resíduos de aminoácidos Cys469, Phe494 e Phe496 da região C-terminal, responsável pela interação com o inibidor (**Figura 16**).

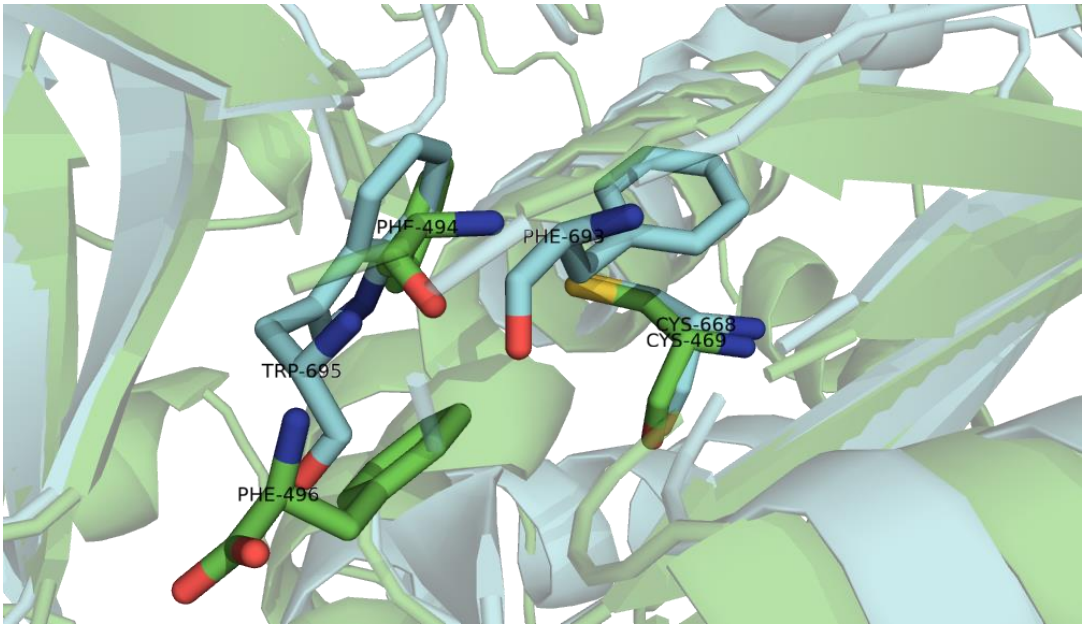



**Figura 16. Alinhamento do modelo *ab initio* do domínio DH da LFR1 de *L. amazonensis.*** O alinhamento foi gerado por aprendizado profundo (verde) com o PDB:5O0X de *Cylindrospermum stagnale* (ciano). Nos resíduos de aminoácidos, os átomos de nitrogênio estão representados em azul, oxigênio em vermelho e enxofre em amarelo.

As informações obtidas da literatura foram suficientes para iniciar a docagem covalente da VAS2870 no sítio desidrogenase da LFR1 preparada por modelagem *ab initio*. O resíduo de aminoácido selecionado (Cys469) é definido como o responsável por realizar a ligação covalente com o ligante e com isso se prossegue o estudo da docagem covalente.

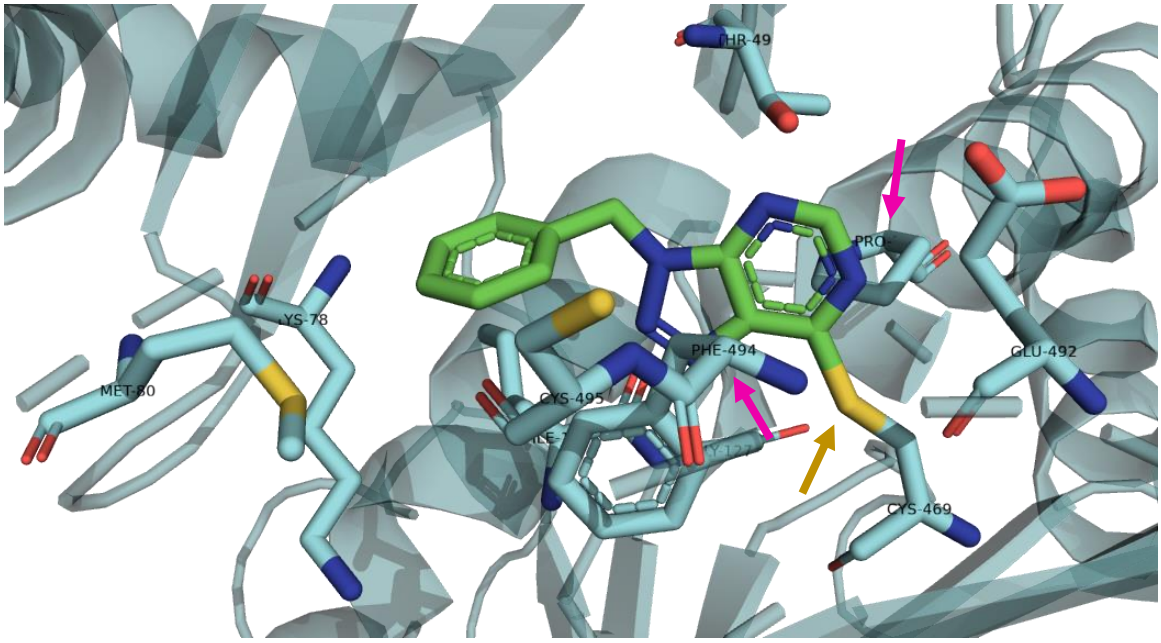
A função de pontuação escolhida para a realização da docagem covalente do ligante no receptor foi a ChemPLP, por obter uma base de cálculo mais indicada para o *GOLD 2023.2.623* (*CCDC Software Ltd. Cambridge, United Kingdom*). Os resultados referentes à docagem covalente foram expostos na **Tabela 2,** onde foi possível observar que os valores de pontuação global apresentados demonstraram resultados satisfatórios, indicando o sucesso da metodologia empregada para interação covalente e intermoleculares do ligante com o sítio.

**Tabela 2.** Valores de s*core* pela função de pontuação ChemPLP para as diferentes conformações do ligante VAS2870 ao sítio DH.

| Conformação | ChemPLP |
|---|---|
| 1 | 82,35 |
| 2 | 82,09 |
| 3 | 83,36 |

Além disso, todas as poses geradas foram observadas visualmente com o software com o software PyMOL 3.0 da Schrödinger e a pose que mais se destacou em valor global de pontuação, foi tratada e pode ser observada na **Figura 17.**

A docagem molecular covalente entre o ligante (inibidor VAS2870) e o receptor (domínio DH da LFR1) (**Figura 17**) mostra que o derivado do VAS2870 se liga covalentemente ao sítio através da Cys469 e ocupa uma posição que permite a interação do tipo empilhamento π-π entre o anel aromático do resíduo Phe494 e o anel pirimidínico deste composto. Além disso, o inibidor também interage com o resíduo Pro130, sendo mais uma interação hidrofóbica capaz de favorecer a estabilidade da ligação do VAS2870 no sítio.



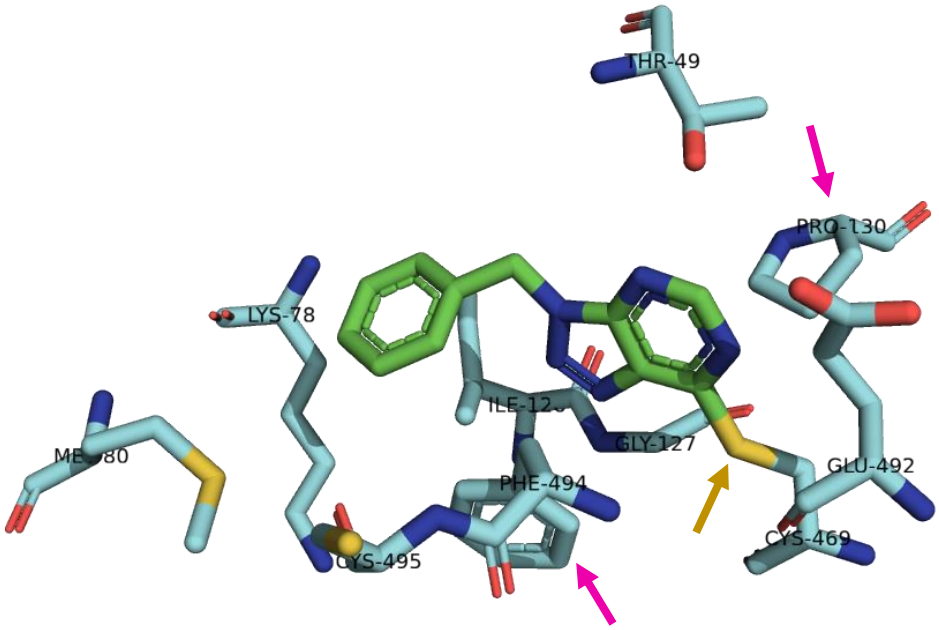



**Figura 17. Modo de interação entre o inibidor VAS2870 (ligante) e o domínio DH (receptor).** O ligante derivado do VAS2870 tem seus carbonos representados pela cor verde, nitrogênios pela cor azul, e enxofre pela cor amarela. O receptor (domínio DH) foi colorido predominantemente em ciano, com os resíduos de aminoácidos com os carbonos representados pela cor ciano, nitrogênios em azul, oxigênios em vermelho e enxofre em amarelo. Interação observada após a docagem covalente analisado utilizando software *PyMOL 3.0* da *Schrödinger*. As principais interações entre o derivado VAS2870 e os resíduos de aminoácidos Phe494, Pro130 estão indicadas pelas setas em magenta e a ligação covalente na cisteína 469 indicada pela seta em amarelo.

Como foi apontado na metodologia da análise *in silico* (descrita na seção **4**, item **4.5**), o cofator FAD foi removido do sítio no modelo gerado para a LFR1 na etapa de docagem com o VAS2870 para permitir a inserção do inibidor em espaço adequado, uma vez que é esperado que o VAS2870 impeça a ligação do cofator à enzima. O domínio DH da csNOX5 (csDH) criado por Magnani e colaboradores possui uma sequência de aminoácidos adicionados em C-terminal após a Phe493 (sequência PWLELAAA) no qual o resíduo Trp695 está posicionado em frente ao anel isoaloxazina do FAD com uma interação de empilhamento π do tipo face a face. É demonstrado de análise *in silico* que embora essa interação dificulte o acesso do anel nicotinamida do NADPH à sua cavidade de ligação para o início da reação, uma mudança de conformação da sequência de resíduos adicionada, gerando um deslocamento do Trp695 permite a interação do NADPH em seu sítio no domínio DH (Magnani *et al*., 2017). Reis e colaboradores demonstraram que a Cys668, principal alvo destacado para o VAS2870, está localizada próxima à região do sítio do FAD, estabilizada com a interação do Trp695 (Reis *et al*., 2020). Com isso, é possível considerar o VAS2870 ligado à cisteína esteja interagindo

também com o anel de isoaloxazina do FAD, devido a sua localização, além de estar localizado entre os resíduos Phe494 e Pro130, que tornam a ligação ainda mais estável.

Esses resultados reforçam a hipótese de que o VAS2870 é um inibidor da LFR1 de *L. amazonensis* e de que seu mecanismo de ação se dá através da modificação direta de um resíduo de cisteína nessa enzima, como observado em outros modelos celulares expressando isoformas de NOXs ou outras enzimas (Reis *et al*., 2020; Sun et al., 2012). Além disso, através de ferramentas precisas com o auxílio de inteligência artificial, foi possível prever parte da estrutura da LFR1, que ainda não possui estruturas cristalográficas disponíveis, e com isso possibilitar futuros estudos adicionais a respeito esta enzima essencial para o metabolismo de *Leishmania*. Diante desses resultados, neste trabalho buscou-se investigar outros efeitos resultantes da possível interação do VAS2870 com a LFR1 no parasito.

### 5.5. Inibição da diferenciação axênica de promastigotas para amastigotas pelo inibidor VAS2870

Como foi mostrado até então, o inibidor VAS2870 em determinadas concentrações atua diretamente sobre a LFR1. Dessa forma, buscou-se investigar se esses efeitos causados pelo inibidor à enzima poderiam afetar de alguma forma a diferenciação axência do parasito, das formas promastigotas metacíclicas para amastigotas, uma vez que Flannery e colaboradores observaram que a LFR1 foi descrita como essencial nesse processo. No estudo, demonstrou-se que espécies mutantes nulas em LFR1 de *Leishmania* apresentam graves defeitos na diferenciação em estágios do ciclo de vida infecciosos. Mesmo em condições que promovam a diferenciação e em presença de fontes abundantes de ferro, sem a LFR1 a diferenciação para estágios infecciosos é incompleta e o parasito possui uma viabilidade reduzida (Flannery *et al*., 2011).

É possível obter culturas axênicas de formas amastigotas de *L. amazonensis* alterando as condições do meio de cultivo, tornando-o mais ácido (pH 4,5 - 5,5) e aumentando a temperatura de incubação (32 - 34 ºC) (Mittra & Andrews, 2013, Clos *et al*., 2022) para mimetizar o ambiente intracelular dos vacúolos parasitóforos dos macrófagos infectados pelo parasito. Diante disso, a **Figura 18A** mostra a curva controle com o número total de formas promastigotas e amastigotas ao longo do período de 96h, contendo apenas o veículo DMSO 1% sem inibidor. 56% das formas promastigotas se diferenciou em amastigotas após 24 h do início da diferenciação, esse número se manteve constante até 72 h de ensaio. Após 96 h de cultivo em meio diferenciação, observa-se uma diminuição no número total de células, sem diferença

estatística perceptível entre o número de amastigotas e promastigotas (Figura 15A), indicando uma possível morte celular dos parasitos. Portanto, para a avaliação seguinte na presença do inibidor, foi considerado apenas o entre 24-72h.

Avaliou-se então o processo da diferenciação celular em função da relação do número de parasitos nas formas amastigotas e promastigotas na presença de concentrações não-citotóxicas do inibidor VAS2870 (como mostrado na **Figura 13E-F)**. Em 24 h foi observada uma menor taxa de diferenciação de formas promastigotas para amastigotas na maior concentração testada, em relação ao controle. A porcentagem de amastigotas diferenciados caiu de 68% para 49,2% na presença de 7,5 µM de VAS2870, enquanto as promastigotas passaram de 32% (controle) para 84,3%. Além disso, observamos um aumento da proliferação dessas formas promastigotas em 35%. Em 48 h, nota-se que a inibição da diferenciação se acentua de forma dose-dependente com o aumento das concentrações de VAS2870, sendo mais significativa nas concentrações de 5 µM e 7,5 µM. Nesse período, houve uma diminuição da porcentagem de amastigotas de 62,8% para 36,4% e 33,6% na presença de 5 µM e 7,5 µM de VAS2870, respectivamente. Concomitantemente, a porcentagem de promastigotas aumentou de 37,1% para 77,3% e 111% respectivamente, acompanhada com um aumento da proliferação dessas formas. O mesmo foi observado em 72 h, onde a porcentagem de amastigotas reduziu significativamente, de 65,8% (controle) para 23,2% e 22,4% nas concentrações de 5 µM e 7,5 µM do inibidor, respectivamente. Nas formas promastigotas houve um aumento de 34,1% para 53,2% e 82%, respectivamente, na presença da VAS2870. Além disso, em 72h, nota-se o efeito tóxico do inibidor, uma vez que a proliferação das formas promastigotas fica reduzida (**Figura 18B**). Os resultados de diferenciação celular na presença do inibidor VAS2870 sugerem que a LFR1 é importante para a diferenciação celular, corroborando com dados existentes na literatura. Além disso, a inibição da via de diferenciação induz a proliferação das formas promastigotas que não conseguiram se diferenciar.

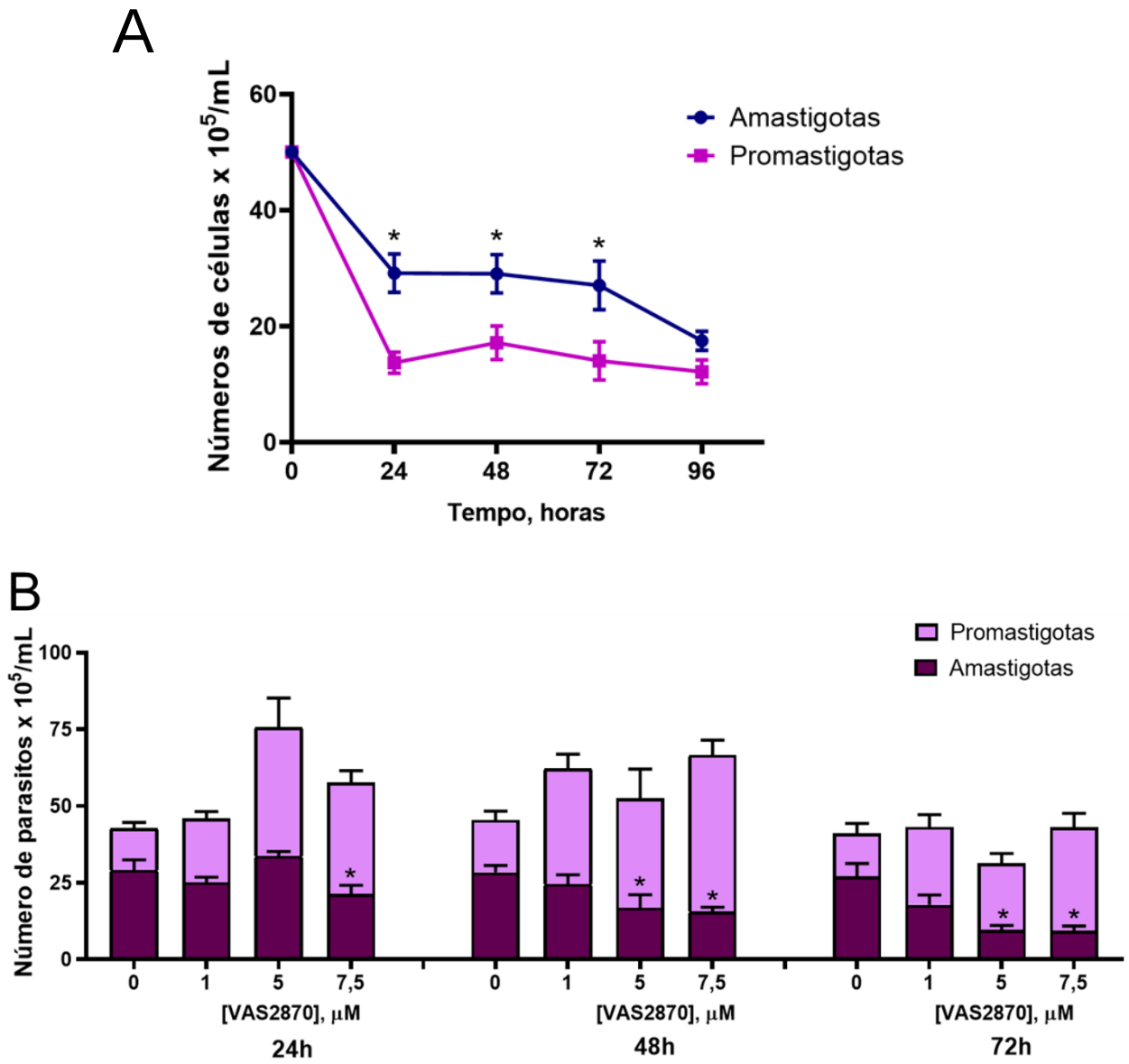



**Figura 18. Inibição da diferenciação axênica de promastigotas para amastigotas pelo inibidor VAS2870.** Promastigotas metacíclicos (5 x $10^6$ parasitos/mL; início da fase estacionária) foram inoculados em placa de 12 poços em meio 199 (pH 5,5) com DMSO 1% (controle) ou concentrações crescentes de VAS2870 conforme indicado na figura. Os parasitos foram incubados a 34 $^{O}$C durante 3 ou 4 dias e a cada 24 h alíquotas foram retiradas para contagem. **(A)** Curva de crescimento dos parasitos-controle (DMSO 1%; sem inibidor) das formas amastigotas e promastigotas ao longo de 72 h. **(B)** Relação entre formas amastigotas e promastigotas tratadas com o inibidor nos períodos de 24, 48 e 72 h. Os valores correspondem à média ± erro padrão de ao menos três experimentos independentes em triplicata. *$P$ < 0,05, conforme avaliado por Test-T de Student, seguido pelo pós-teste Mann-Whitney.

*Leishmania spp* são capazes de traduzir os fatores de estresse ambientais como redução do pH e aumento da temperatura em sinais que estimulam a diferenciação celular. Durante o desenvolvimento do parasito em seus hospedeiros, a comunicação a transmissão de sinais consequentes de fosforilação de proteínas e outras modificações pós-traducionais que podem ocorrer na comunicação entre esses organismos, geram respostas específicas desempenham um

papel crucial nesses processos (Cosentino-Gomes & Meyer-Fernandes, 2011; Tsigankov *et al*. 2013). Em *Leishmania*, como em todos os eucariotos, as proteínas quinases regulam funções essenciais na célula, incluindo a progressão do ciclo celular, diferenciação e virulência. Embora essas proteínas sejam estruturalmente diferentes em comparação a mesma classe em mamíferos, evidências mostram uma funcionalidade semelhante como é o caso das proteínas quinase C (PKCs) (Alvarez et al., 2002; Alvarez-Rueda et al., 2009). Embora ainda existam lacunas a respeito do envolvimento das PKCs em vias de sinalização em *Leishmania spp*, o envolvimento dessas enzimas nas interações celulares e transdução de sinais tornam-nas um alvo relevante na busca de fármacos que atuem contra o desenvolvimento desse protozoário (Alvarez *et al*., 2002; Efstathiou & Smirlis, 2021).

Almeida-Amaral e colaboradores sugeriram que o heme desempenha um papel modulador fundamental em vias de transdução de sinal de *L. amazonensis*. Foi demonstrado que esse cofator é capaz de estimular a atividade da enzima $Na^+/K^+$ATPase, através da ativação da via de sinalização da fosfolipase C específica para fosfatidilinositol, com envolvimento da proteína quinase C (PI-PLC/PKC) dependente de um receptor de heme em promastigotas de L. amazonensis (Almeida-Amaral *et al*., 2007) Essa via atua gerando segundos mensageiros que aumentam a fosforilação de proteínas, o que regula uma série de processos celulares (Irvine et al., 2002; Lefèvre et al., 2007; Almeida-Amaral et al., 2007). Posteriormente, foi descrito que uma via de sinalização ativada por heme causa aumento do $H_2O_2$ intracelular, o que leva à ativação de uma PKC e resulta num aumento da atividade da $Na^+/K^+$ATPase em L. amazonensis (Rocco-Machado *et al*., 2015). Além disso, foi observado que a atividade da $Na^+/K^+$ ATPase é maior para as formas amastigotas que promastigotas. Uma vez que a fonte desse $H_2O_2$ gerado é a LFR1 esses dados reforçaram a evidência de que esses eventos estariam então envolvidos no processo diferenciação celular do parasito (Rocco-Machado *et al*., 2019).

A participação da $Na^+/K^+$ ATPase no metabolismo de tripanossomatídeos ainda não foi totalmente descrita, no entanto essa enzima tem uma função essencial na homeostase iônica do parasito e além de sua atividade de bombeamento é capaz de controlar o fluxo de diversos outros componentes celulares (Almeida-Amaral *et al*., 2007). Em modelo de células epiteliais de mamíferos (MDCK), a modulação dessa enzima resulta em efeitos na interação célula-célula, tanto caracterizando o processo de adesão entre essas células quanto na comunicação direta entre vias de sinalização com a $Na^+/K^+$ ATPase como um receptor transdutor de sinal (Contreras *et al*., 2024). Além do efeito de bomba de íons, a $Na^+/K^+$ ATPase também é capaz de disparar cascatas de sinalização mediadas por ROS como segundos mensageiros (Liu *et al*., 2000; Pratt *et al*., 2018).

Lu e colaboradores em 2019 sugeriram que o VAS2870, além de ser um inibidor de NOX, tem uma atividade adicional independente de NOX, atuando na via das PKCs. Em modelo celular humano, o estudo sugere que os compostos VAS em concentrações de 5 a 10 µM podem bloquear a formação de EROs mediadas por PKCs, ou o curso da via de sinalização, e com isso exercer efeitos antiplaquetários (Lu *et al*., 2019). Esse efeito, embora caracterizado como "fora do alvo" no contexto de inibição de NOXs, torna-se interessante diante do possível envolvimento dessas proteínas no processo de diferenciação de *L. amazonensis* discutido acima. Dessa forma, os resultados sugerem que o VAS2870 pode estar inibindo a diferenciação do parasito pela interação direta com a LFR1 ou através de uma via alternativa relacionada à atividade das PKCs em *L. amazonensis*.

### 5.6. Infecção de macrófagos por *L. amazonensis* na presença do inibidor VAS2870

Com base na hipótese da inibição da atividade NOX da LFR1 pelo VAS2870 em concentrações menores que 1 µM, mostrada na **Figura 12A,** prosseguiu-se com os ensaios de infecção concomitantemente aos ensaios descritos em 4.4, de modo a avaliar o impacto do inibidor VAS2870 na infecção de macrófagos por *L. amazonensis* em macrófagos peritoneais murinos e macrófagos de linhagem celular (RAW), após um período de 48h.

A **figura 19A** mostra que o pré-tratamento dos parasitos com VAS2870 a 1 µM pelo período de 15 minutos não foi capaz de reduzir a porcentagem de macrófagos infectados em relação ao controle não tratado. Nessas mesmas condições, observa-se que a proporção de macrófagos infectados por *L. amazonensis* foi cerca de 1,5 vezes maior que o controle não-tratado (**Figura 19B**). Observa-se também que, o número de amastigotas intracelulares por macrófago não foi alterado em relação ao controle não-tratado (**Figura 19C**).

De modo semelhante, não houve diferença significativa entre a porcentagem de macrófagos RAW infectados por *L. amazonensis* pré tratados com 1 µM de VAS2870 pelo período de 15 minutos e o controle não tratado (**Figura 20A**). Além disso, o índice de infecção (**Figura 20B**) e o número de amastigotas por macrófago (**Figura 20C**) também não demonstraram diferença significativa entre esses grupos. Isso também pôde ser observado nas imagens em microscopia de luz desssas células infectadas. O perfil de infecção por *L. amazonensis* pré-tratados com VAS2870 não exibe diferença significativa em relação ao controle não-tratado, mostrando numerosas formas amastigotas intracelulares presentes em diversos vacúolos parasitóforos (PVs) formados (**Figura 21**).

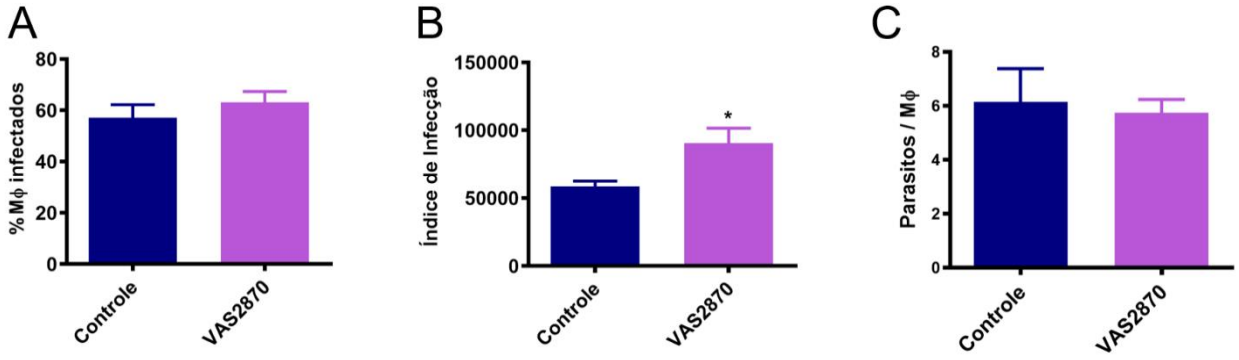



**Figura 19. Infecção de macrófagos peritoneais murinos por *L. amazonensis* em presença do inibidor VAS2870.** Macrófagos peritoneais de camudongos Balb/c foram tratados com o 1 µM de VAS2870 por 15 minutos e posteriormente infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* na razão de 1:10 por pelo menos 48 horas a 35 °C com atmosfera de 5% de $CO_2$. As formas amastigotas fagocitadas foram quantificadas e o índice de infecção calculado. (a) Porcentagem de macrófagos (MΦ) infectados (B) Índice de Infecção; (C) Parasitos (amastigotas intracelulares) por macrófagos. Os valores correspondem à média ± erro padrão de ao menos três experimentos independentes em triplicata. *$P < 0,05$.

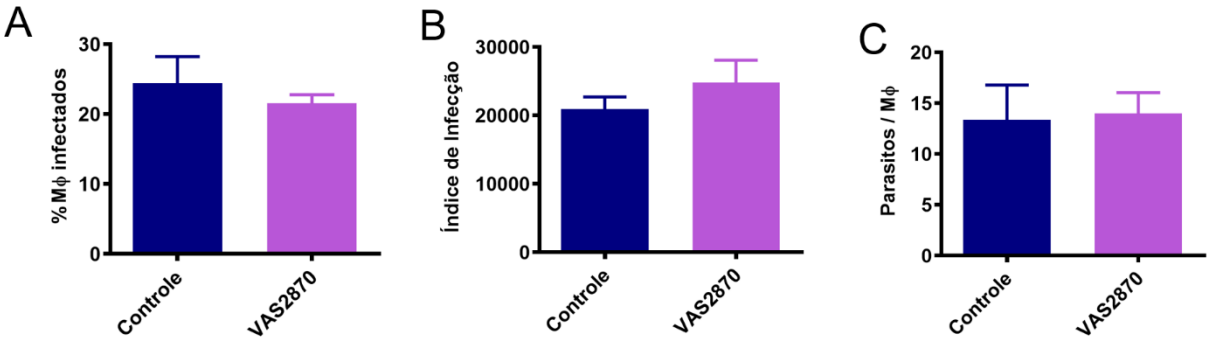



**Figura 20. Infecção de macrófagos murinos RAW por *L. amazonensis* em presença do inibidor VAS2870.** Macrófagos murinos de linhagem (RAW) foram tratados com o 1 µM de VAS2870 por 15 minutos e posteriormente infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* na razão de 1:10 por pelo menos 48 horas a 35 °C com atmosfera de 5% de $CO_2$. As formas amastigotas fagocitadas foram quantificadas e o índice de infecção calculado. (a) Porcentagem de macrófagos (MΦ) infectados (B) Índice de Infecção; (C) Parasitos (amastigotas intracelulares) por macrófago. Os valores correspondem à média ± erro padrão de ao menos três experimentos independentes em triplicata.

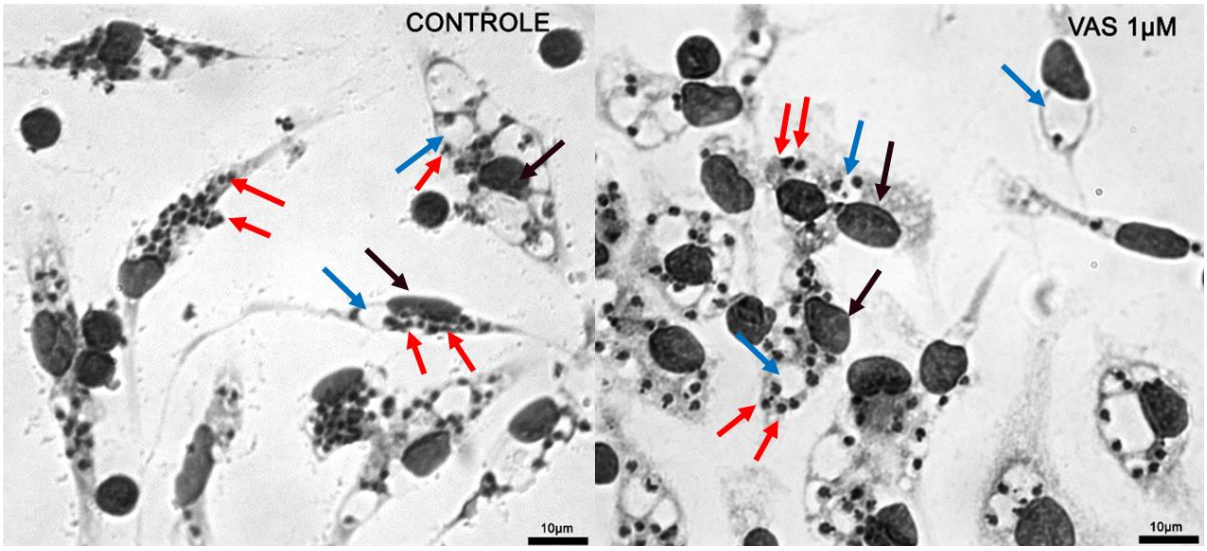



**Figura 21. Imagens por microscopia de infecção de macrófagos murinos RAW por *L. amazonensis.*** Macrófagos peritoneais de camudongos Balb/c foram incubados por 48h por parasitos não tratados previamente (controle) ou pré-tratados com 1µM de VAS2870 (VAS 1µM ). Os núcleos dos macrófagos estão indicados por setas pretas, os vacúolos parasitóforos (PVs) formados estão indicados por setas azuis e amastigotas de *L. amazonensis* envolvidas por PVs estão indicadas por setas vermelhas.

Neste estudo, como foi observado anteriormente, o VAS2870 só demonstrou um efeito sobre a diferenciação celular do parasito a partir da concentração de 5 µM. No entanto, nas condições testadas nesse trabalho, o VAS2870 não apresentou efeito na infecção dos macrófagos por *L. amazonensis*. Duas hipóteses podem justificar a ausência de efeito do VAS2870 na infecção: 1) O período de pré-tratamento dos parasitos antes da infecção (15 minutos) não foi suficiente para que a provável inibição da LFR1 ocorresse, afetando a diferenciação dos parasitos. Reis e colaboradores demonstraram que o VAS2870 inibiu as isoformas NOX2, NOX4 e NOX5 de forma significativa a partir de um período de incubação de 2 horas, mostrando que a potência da inibição desse composto aumenta com o tempo (Reis *et al*., 2020). Faz-se necessário também considerar que não há dados sobre a difusibilidade na membrana de compostos não tão solúveis como o VAS2870 (Hetch *et al*., 2017; Augsburger et al., 2017), o que sugere a necessidade de se avaliar se essa propriedade que o também interfere no tempo de exposição dos parasitos à molécula. É muito importante destacar também que a possível ligação covalente do VAS2870 no sítio no domínio DH (sítio de ligação do NADPH) da enzima da LFR1, demonstrada através dos estudos *in silico* neste trabalho também sugere a necessidade de um maior tempo de exposição dos parasitos ao composto, devido à estabilidade de interação neste tipo de ligação. 2) O pré-tratamento pode estar induzindo o aumento da proliferação das formas promastigotas, conforme visto nos resultados obtidos no processo de

diferenciação. Esses ensaios de infecção demonstram de maneira preliminar os efeitos do inibidor VAS2870 em relação à virulência de *L. amazonensis*, dentro das condições nas quais foram avaliados. Assim, novos ensaios de infecção precisam ser conduzidos considerando também o pós-tratamento das células infectadas com o inibidor e, além disso, por um maior tempo de incubação.

## 6. CONCLUSÕES

A partir do que foi demonstrado neste trabalho, é possível concluir que os inibidores de NOXs estudados apresentaram diferentes perfis de inibição da atividade NOX da LFR1 de *L. amazonensis*. O Setanaxib apresentou inibição a partir de altas concentrações; o GKT136901 e o VAS2870 foram capazes de inibir essa atividade a partir de baixas concentrações, porém o composto VAS2870 mostrou um perfil diferente para concentrações mais altas, indicando outros efeitos geradores de ROS em *L. amazonensis*.

Os ensaios de citotoxicidade desses compostos frente a promastigotas de *L. amazonensis* apontaram que somente o inibidor VAS2870 mostrou-se tóxico ao parasito nas condições testadas.

Além dos efeitos observados do inibidor VAS2870 na atividade NOX da LFR1, o composto também foi capaz de inibir a atividade ferro-redutásica dessa enzima de formas promastigotas de *L. amazonensis*. Diante disso, sob a hipótese da possível interação desse inibidor diretamente com a LFR1, os estudos *in silico* mostraram que o inibidor VAS2870 se liga de forma covalente a um sítio no domínio desidrogenase (DH) da LFR1 criado por modelagem *ab initio*.

Os ensaios de diferenciação de formas promastigotas em culturas axênicas em presença do inibidor VAS2870 mostram que o inibidor reduz a porcentagem de formas amastigotas ao longo do período avaliado. Dessa forma, os resultados sugerem que o VAS2870 pode estar inibindo a diferenciação do parasito pela interação direta com a LFR1. Curiosamente, os ensaios de inibição de infectividade de parasitos pré-tratados com o VAS2870 frente a macrófagos murinos mostrou que o pré-tratamento não foi eficaz nos períodos testados, não apresentando efeito esperado. Porém não se deve descartar que novos ensaios de infecção possam ser conduzidos, considerando outras condições de tratamento. Além disso, não é descartada a

necessidade de estudos mais aprofundados a respeito do VAS2870 e dos demais inibidores de NOXs, diante do que foi observado anteriormente.

Em conjunto, esses resultados fortalecem as evidências de que a LFR1 constitui um alvo promissor a ser explorado na quimioterapia contra as doenças causadas por *Leishmania spp*. Esse trabalho fornece também uma nova abordagem a respeito do funcionamento da LFR1 e de seu mecanismo catalítico através da interação dessa enzima com conhecidos inibidores de NOXs.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS


ABRAMSON, Josh et al. Accurate structure prediction of biomolecular interactions with AlphaFold 3. **Nature**, v. 630, n. 8016, p. 493-500, 2024.

AKHOUNDI, M., KUHLS, K., CANNET, A., VOTÝPKA, J., MARTY, P., DELAUNAY, P., & SERENO, D. A Historical Overview of the Classification, Evolution, and Dispersion of *Leishmania* Parasites and Sandflies. **PLoS Neglected Tropical Diseases,** 10(3), 1–40. 2016.

ALMEIDA-AMARAL, Elmo Eduardo et al. Leishmania amazonensis: Heme stimulates (Na++ K+) ATPase activity via phosphatidylinositol-specific phospholipase C/protein kinase C-like (PI-PLC/PKC) signaling pathways. **Experimental parasitology**, v. 124, n. 4, p. 436-441, 2010.

ALTENHÖFER, S., KLEIKERS, P. W. M., RADERMACHER, K. A., SCHEURER, P., ROB HERMANS, J. J., SCHIFFERS, P., HO, H., WINGLER, K., & SCHMIDT, H. H. H. W. The NOX toolbox: validating the role of NADPH oxidases in physiology and disease. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 69(14), 2327–2343. 2012.

ALTENHÖFER, S., RADERMACHER, K. A., KLEIKERS, P. W. M., WINGLER, K., & SCHMIDT, H. H. H. W. Evolution of NADPH oxidase inhibitors: Selectivity and mechanisms for target engagement. **Antioxidants and Redox Signaling**, 23(5), 406–427. 2015.

ALVAREZ, Nidia et al. Inhibition of parasite protein kinase C by new antileishmanial imidazolidin-2-one compounds. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 17, n. 6, p. 443-447, 2002.

ALVAREZ-RUEDA, Nidia; BIRON, Marlène; LE PAPE, Patrice. Infectivity of Leishmania mexicana is associated with differential expression of protein kinase C-like triggered during a cell-cell contact. **PLoS One**, v. 4, n. 10, p. e7581, 2009.

APEL, K., & HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, oxidative stress, and signal transduction. **Annual Review of Plant Biology**, 55, 373–399. 2004.

ASSOUAB, A. et al. Cutaneous leishmaniasis and iron metabolism: current insights and challenges. **Frontiers in Immunology**, v. 15, 3 dez. 2024.

AUGSBURGER, F., FILIPPOVA, A., RASTI, D., SEREDENINA, T., LAM, M., MAGHZAL, G., MAHIOUT, Z., JANSEN-DÜRR, P., KNAUS, U. G., DOROSHOW, J., STOCKER, R.,

KRAUSE, K.-H., & JAQUET, V. Pharmacological characterization of the seven human NOX isoforms and their inhibitors. **Redox Biology**, 26, 101272. 2019.

AUGUGLIARO, A., DUSONCHET, L., FAVUZZA, S., IPPOLITO, M. G., & RIVA SANSEVERINO, E. Feasible domain-driven genetic operatorsfor distribution systems optimal reconfiguration. **International Review of Electrical Engineering**, 5(6), 2855–2866. 2010.

AVERILL-BATES, Diana. Reactive oxygen species and cell signaling. Review. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Cell Research**, v. 1871, n. 2, p. 119573, 2024.

BAKER, N. et al. Systematic functional analysis of *Leishmania* protein kinases identifies regulators of differentiation or survival. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1244, 23 fev. 2021.

BALAÑA-FOUCE, R. et al. The Pharmacology of Leishmaniasis. **General Pharmacology**: The Vascular System, v. 30, n. 4, p. 435–443, abr. 1998.

BARUA, S., KIM, J. Y., YENARI, M. A., & LEE, J. E. The role of NOX inhibitors in neurodegenerative diseases. **IBRO Reports**, 7(February), 59–69. 2019.

BASMACIYAN, L., & CASANOVA, MLa mort cellulaire chez *Leishmania*. **Parasite** (Paris, France), 26, 71. 2019.

BATES, P. A. *Leishmania* sand fly interaction: progress and challenges. **Current Opinion in Microbiology,** v. 11, n. 4, p. 340–344, ago. 2008.

BEDARD, K., & KRAUSE, K.-H. The NOX Family of ROS-Generating NADPH Oxidases: Physiology and Pathophysiology. **Physiological Reviews**, 87(1), 245–313. 2007.

BEN-OTHMAN, R., FLANNERY, A. R., MIGUEL, D. C., WARD, D. M., KAPLAN, J., & ANDREWS, N. W. *Leishmania*-Mediated Inhibition of Iron Export Promotes Parasite Replication in Macrophages. **PLoS Pathogens**, 10(1), e1003901. 2014.

BESTEIRO, S., WILLIAMS, R. A. M., COOMBS, G. H., & MOTTRAM, J. C.. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. **International Journal for Parasitology**, 37(10), 1063–1075. 2007.

BEZEMER JM, VAN DER ENDE J, LIMPENS J, DE VRIES HJC, SCHALLIG HDFH. Safety and efficacy of allylamines in the treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: A systematic review. **PLoS One**. 2021 Apr 7;16(4):e0249628. doi: 10.1371/journal.pone.0249628. PMID: 33826660; PMCID: PMC8026199.

BIENERT, G. P., SCHJOERRING, J. K., & JAHN, T. P. Membrane transport of hydrogen peroxide. Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - **Biomembranes**, 1758(8), 994–1003. 2006.

BIENERT, Gerd P.; SCHJOERRING, Jan K.; JAHN, Thomas P. Membrane transport of hydrogen peroxide. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Biomembranes**, v. 1758, n. 8, p. 994-1003, 2006.

BOSCARO, Carlotta et al. The antiangiogenic effect of digitoxin is dependent on a ROS-elicited RhoA/ROCK pathway activation. **Biochemical Pharmacology**, v. 222, p. 116049, 2024.

BUCK, A., SANCHEZ KLOSE, F. P., VENKATAKRISHNAN, V., KHAMZEH, A., DAHLGREN, C., CHRISTENSON, K., & BYLUND, J. DPI Selectively Inhibits Intracellular NADPH Oxidase Activity in Human Neutrophils. **ImmunoHorizons**, 3(10), 488–497. 2019.

BUONOCORE, G., PERRONE, S., & TATARANNO, M. L. Oxygen toxicity: Chemistry and biology of reactive oxygen species. **Seminars in Fetal and Neonatal Medicine**, 15(4), 186–190. 2010.

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

CADENAS, E., & DAVIES, K. J. A. Mitochondrial free radical generation, oxidative stress, and aging. **Free Radical Biology and Medicine**, 29(3–4), 222–230. 2000.

CAMBRIDGE CRYSTALLOGRAPHIC DATA CENTRE. GOLD Tutorial: Flexibility and Constraints. **Cambridge: CCDC Software Ltd**., 2020. Disponível em: https://www.ccdc.cam.ac.uk/support-and-resources/ccdcresources/. Acesso em: 10 de junho de 2025

CAMBRIDGE CRYSTALLOGRAPHIC DATA CENTRE. GOLD User Guide. **Cambridge: CCDC Software Ltd.**, 2025. Disponível em: https://www.ccdc.cam.ac.uk/solutions/software/gold/. Acesso em: 10 de junho de 2025.

CARSTENS-KASS J, PAULINI K, LYPACZEWSKI P, MATLASHEWSKI G. A review of the leishmanin skin test: A neglected test for a neglected disease. **PLoS Negl Trop Dis**. 2021 Jul 22;15(7):e0009531. doi: 10.1371/journal.pntd.0009531. PMID: 34292942; PMCID: PMC8297750.

CASTRO-PINTO, D. B., FABRINO, D. L., & LEON, L. A Importância de Radicais Livres Durante a Infecção por Protozoários do Gênero *Leishmania*. **Leishmanioses Do Continente Americano** [Online]., 121–136. 2014.

CDC. CDC. Centers for Desease Control and Prevention. **Leishmaniasis**. Disponível em: https://www.cdc.gov/leishmaniasis/about/index.html. Acesso em 12 mai. 2024.

CECÍLIO, P.; CORDEIRO-DA-SILVA, A.; OLIVEIRA, F. Sand flies: Basic information on the vectors of leishmaniasis and their interactions with *Leishmania* parasites. **Communications Biology,** v. 5, n. 1, p. 305, 4 abr. 2022.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Current and emerging medications for the treatment of leishmaniasis. **Expert Opinion on Pharmacotherapy**, v. 20, n. 10, p. 1251–1265, 2019.

CIFUENTES-PAGANO, M., MEIJLES, D., & PAGANO, P. NOX Inhibitors & Therapies: Rational Design of Peptidic and Small Molecule Inhibitors. **Current Pharmaceutical Design**, 21(41), 6032–6035. 2015.

CIRCU, M. L., & AW, T. Y. Reactive oxygen species, cellular redox systems, and apoptosis. **Free Radical Biology and Medicine**, 48(6), 749–762. 2010.

CLOS, J.; GRÜNEBAST, J.; HOLM, M. Promastigote-to-Amastigote Conversion in *Leishmania spp*.—**A Molecular View. Pathogens**, v. 11, n. 9, p. 1052, 1 set. 2022.

CONDE, L. et al. Humoral response in Leishmaniasis. Frontiers in Cellular and Infection **Microbiology**, v. 12, 12 dez. 2022.

COSENTINO-GOMES, D. Reversible Inhibition of Tyrosine Protein Phosphatases by Redox Reactions. **In Enzyme Inhibition and Bioapplications**. InTech. 2012.

COSENTINO-GOMES, D., ROCCO-MACHADO, N., & MEYER-FERNANDES, J. R. Cell Signaling through Protein Kinase C Oxidation and Activation. **International Journal of Molecular Sciences**, 13(9), 10697–10721. 2012.

COSTA, J. M. L., COSTA, A. A. U. M. L., ELKHOURY, A. N., BEZERRIL, A. C. R., BARRAL, A., & SALDANHA, A. C. R. (2009). Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) no Brasil após 60 anos de sua primeira descrição. **Gazeta Médica Da Bahia**, 79(Supl. 3), 16–24.

COSTA-DA-SILVA, A. C. et al. Immune Responses in Leishmaniasis: An Overview. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, v. 7, n. 4, p. 54, 31 mar. 2022.

CROSS, Andrew R.; JONES, Owen TG. The effect of the inhibitor diphenylene iodonium on the superoxide-generating system of neutrophils. Specific labelling of a component polypeptide of the oxidase. **Biochemical Journal**, v. 237, n. 1, p. 111-116, 1986.

DAO VT, ELBATREEK MH, ALTENHÖFER S, CASAS AI, PACHADO MP, NEULLENS CT, KNAUS UG, SCHMIDT HHHW. Isoform-selective NADPH oxidase inhibitor panel for pharmacological target validation. **Free Radic Biol Med**. 20;148:60-69. 2020.

DE MACEDO-SILVA, S. T. et al. In Vitro Activity of the Antifungal Azoles Itraconazole and Posaconazole against *Leishmania amazonensis*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, p. e83247, 23 dez. 2013.

DE PABLOS, L.; FERREIRA, T.; WALRAD, P. Developmental differentiation in *Leishmania* lifecycle progression: post-transcriptional control conducts the orchestra. **Current Opinion in Microbiology**, v. 34, p. 82–89, dez. 2016.

DE VRIES, H. J. C.; SCHALLIG, H. D. Cutaneous Leishmaniasis: A 2022 Updated Narrative Review into Diagnosis and Management Developments. **American Journal of Clinical Dermatology**, v. 23, n. 6, p. 823–840, 14 nov. 2022.

DELIYANTI, Devy; WILKINSON-BERKA, Jennifer L. Inhibition of NOX1/4 with GKT137831: a potential novel treatment to attenuate neuroglial cell inflammation in the retina. **Journal of neuroinflammation**, v. 12, p. 1-13, 2015.

DEMIRCAN, Muhammed Burak et al. Combined activity of the redox-modulating compound setanaxib (GKT137831) with cytotoxic agents in the killing of acute myeloid leukemia cells. **Antioxidants**, v. 11, n. 3, p. 513, 2022.

DI BELLO, G., VENDEMIALE, G., & BELLANTI, F. Redox cell signaling and hepatic progenitor cells. **European Journal of Cell Biology**, 97(8), 546–556. 2018.

DOCAMPO R, VERCESI AE. Mitochondrial $Ca^{2+}$ and Reactive Oxygen Species in Trypanosomatids. **Antioxid Redox Signal**. (13-15):969-983. 2022.

EFSTATHIOU, Antonia; SMIRLIS, Despina. Leishmania protein kinases: important regulators of the parasite life cycle and molecular targets for treating leishmaniasis. **Microorganisms**, v. 9, n. 4, p. 691, 2021.

FERREIRA, M. J., RODRIGUES, T. A., PEDROSA, A. G., SILVA, A. R., VILARINHO, B. G., FRANCISCO, T., & AZEVEDO, J. E. Glutathione and peroxisome redox homeostasis. **Redox Biology**, 67, 102917. 2023.

FERREIRA, Maria J. et al. Glutathione and peroxisome redox homeostasis. **Redox Biology**, v. 67, p. 102917, 2023.

FIOCRUZ. (2024). **Leishmaniose**. Disponível em: https://portal.fiocruz.br/doenca/leishmaniose. Acesso em 20 abr. 2024.

FLANNERY, A. R., HUYNH, C., MITTRA, B., MORTARA, R. A., & ANDREWS, N. W. LFR1 ferric iron reductase of *Leishmania amazonensis* is essential for the generation of infective parasite forms. **Journal of Biological Chemistry**, 286(26), 23266–23279. 2011

FLANNERY, A. R., RENBERG, R. L., & ANDREWS, N. W. Pathways of iron acquisition and utilization in *Leishmania*. **Current Opinion in Microbiology**, 16(6), 716–721. 2013.

FLOHÉ, L.. The impact of thiol peroxidases on redox regulation. **Free Radical Research**, 50(2), 126–142. 2016.

FRÉZARD, F., DEMICHELI, C., & RIBEIRO, R. R. Pentavalent antimonials: New perspectives for old drugs. **Molecules**, 14(7), 2317–2336. 2009.

FUKAI, T., & USHIO-FUKAI, M. Cross-Talk between NADPH Oxidase and Mitochondria: Role in ROS Signaling and Angiogenesis. **Cells**, 9(8), 1849. 2020.

GARCÍA, J. G., ANSORENA, E., IZAL, I., ZALBA, G., DE MIGUEL, C., & MILAGRO, F. I. Structure, regulation, and physiological functions of NADPH oxidase 5 (NOX5). **Journal of Physiology and Biochemistry**, 79(2), 383–395. 2023.

GATTO JR, Gregory J. et al. NADPH oxidase-dependent and-independent mechanisms of reported inhibitors of reactive oxygen generation. **Journal of enzyme inhibition and medicinal chemistry**, v. 28, n. 1, p. 95-104, 2013.

GERUSSI, A. et al. Multiple therapeutic targets in rare cholestatic liver diseases: Time to redefine treatment strategies. **Annals of Hepatology**, v. 19, n. 1, p. 5–16, 1 jan. 2020.

GONENC, B., GEHLBACH, P., HANDA, J., TAYLOR, R. H., & IORDACHITA, I. NIH Public Access. **Int Conf Biomed Robot Biomechatron**., 23(1), 244–251. 2014.

GRISSA, I., BIDARD, F., GROGNET, P., GROSSETETE, S., & SILAR, P. The Nox/Ferric reductase/Ferric reductase-like families of Eumycetes. **Fungal Biology**, 114(9), 766–777. 2010.

HECHT, Nina et al. Opening NADPH oxidase inhibitors for in vivo translation. **European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics**, v. 115, p. 206-217, 2017.

IBARRA-MENESES, A. V., MORENO, J., & CARRILLO, E. New Strategies and Biomarkers for the Control of Visceral Leishmaniasis. **Trends in Parasitology**, 36(1), 29–38. 2020.

INVERNIZZI, Pietro et al. Setanaxib, a first-in-class selective NADPH oxidase 1/4 inhibitor for primary biliary cholangitis: a randomized, placebo-controlled, phase 2 trial. **Liver International**, v. 43, n. 7, p. 1507-1522, 2023.

JUAN, C. A., PÉREZ DE LA LASTRA, J. M., PLOU, F. J., & PÉREZ-LEBEÑA, E. The Chemistry of Reactive Oxygen Species (ROS) Revisited: Outlining Their Role in Biological Macromolecules (DNA, Lipids and Proteins) and Induced Pathologies. **International Journal of Molecular Sciences**, 22(9), 4642. 2021.

JUAN, Celia Andrés et al. The chemistry of reactive oxygen species (ROS) revisited: outlining their role in biological macromolecules (DNA, lipids and proteins) and induced pathologies. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 9, p. 4642, 2021.

KARAKUZU, O. et al. Amplex red assay for measuring hydrogen peroxide production from caenorhabditis elegans. **Bio-protocol**, v. 9, n. 21, 5 nov. 2019.

KAUFER, A., ELLIS, J., STARK, D., & BARRATT, J. The evolution of trypanosomatid taxonomy. **Parasites and Vectors**, 10(1), 1–17. 2017.

KAYE, P., & SCOTT, P.. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, 9(8), 604–615. 2011.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host–pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 11 ago. 2011.

KEVRIC, I., CAPPEL, M. A., & KEELING, J. H. New World and Old World *Leishmania* Infections: A Practical Review. **Dermatologic Clinics**, 33(3), 579–593. 2015.

KHAN, Yousuf A.; ANDREWS, Norma W.; MITTRA, Bidyottam. ROS regulate differentiation of visceralizing Leishmania species into the virulent amastigote form. **Parasitology open**, v. 4, p. e19, 2018.

KONNO, T., MELO, E. P., CHAMBERS, J. E., & AVEZOV, E. Intracellular Sources of ROS/H2O2 in Health and Neurodegeneration: Spotlight on Endoplasmic Reticulum. **Cells**, 10(2), 233. 2021.

KUAI, Y., LIU, H., LIU, D., LIU, Y., SUN, Y., XIE, J., SUN, J., FANG, Y., PAN, H., & HAN, W. An ultralow dose of the NADPH oxidase inhibitor diphenyleneiodonium (DPI) is an economical and effective therapeutic agent for the treatment of colitis-associated colorectal cancer. **Theranostics**, 10(15), 6743–6757. 2020.

LAMBETH, J. D., CHENG, G., ARNOLD, R. S., & EDENS, W. A. Novel homologs of gp91phox. **Trends in Biochemical Sciences**, 25(10), 459–461. 2000.

LENNICKE, C., & COCHEMÉ, H. M. Redox metabolism: ROS as specific molecular regulators of cell signaling and function. **Molecular Cell**, 81(18), 3691–3707. 2021.

LENNICKE, Claudia; COCHEMÉ, Helena M. Redox metabolism: ROS as specific molecular regulators of cell signaling and function. **Molecular cell**, v. 81, n. 18, p. 3691-3707, 2021.

LI, Y., & TRUSH, M. A. Diphenyleneiodonium, an NAD(P)H Oxidase Inhibitor, also Potently Inhibits Mitochondrial Reactive Oxygen Species Production. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 253(2), 295–299. 1998.

LI, Yu-jie et al. Activation of p47phox as a mechanism of bupivacaine-induced burst production of reactive oxygen species and neural toxicity. **Oxidative Medicine and Cellular Longevity**, v. 2017, n. 1, p. 8539026, 2017.

LINDOSO, J., MOREIRA, C., CUNHA, M., & QUEIROZ, I. T. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection: current perspectives. HIV/AIDS - **Research and Palliative Care**, Volume 10, 193–201. 2018.

LIOCHEV, S. I. Reactive oxygen species and the free radical theory of aging. **Free Radical Biology and Medicine**, 60, 1–4. 2013.

LIU, Jiang et al. Ouabain interaction with cardiac Na+/K+-ATPase initiates signal cascades independent of changes in intracellular Na+ and Ca2+ concentrations. **Journal of Biological Chemistry**, v. 275, n. 36, p. 27838-27844, 2000.

LIU, Y. et al. A predicted structure of NADPH Oxidase 1 identifies key components of ROS generation and strategies for inhibition. **PLOS ONE**, v. 18, n. 5, p. e0285206, 1 maio 2023.

LIU, Zhong et al. NADPH oxidase inhibitor regulates microRNAs with improved outcome after mechanical reperfusion. **Journal of NeuroInterventional Surgery**, v. 9, n. 7, p. 702-706, 2017.

LU, W. J., LI, J. Y., CHEN, R. J., HUANG, L. T., LEE, T. Y., & LIN, K. H. VAS2870 and VAS3947 attenuate platelet activation and thrombus formation via a NOX-independent pathway downstream of PKC. **Scientific Reports**, 9(1), 1–13. 2019.

LU, Wan Jung et al. VAS2870 and VAS3947 attenuate platelet activation and thrombus formation via a NOX-independent pathway downstream of PKC. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 18852, 2019.

MAGNANI, Francesca et al. Crystal structures and atomic model of NADPH oxidase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 26, p. 6764-6769, 2017.

MARTÍNEZ-GARCÍA M., CAMPOS-SALINAS J., CABELLO-DONAYRE M., PINEDA-MOLINA E., GÁLVEZ F.J., ORREGO L.M., SÁNCHEZ-CAÑETE M.P., MALAGARIE-CAZENAVE S., KOELLER D.M., PÉREZ-VICTORIA J.M. LmABCB3, an atypical mitochondrial ABC transporter essential for *Leishmania major* virulence, acts in heme and cytosolic iron/sulfur clusters biogenesis. **Parasit Vectors**. 2016

MARTINS-MELO, F. R. et al. Mortality from neglected tropical diseases in Brazil, 2000–2011. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 94, n. 2, p. 103–110, 1 fev. 2016.

MASSARI, Marta et al. Evolutionary and structural analyses of the NADPH oxidase family in eukaryotes reveal an initial calcium dependency. **Redox Biology**, v. 56, p. 102436, 2022.

MATHUR, T. et al. Novel Azoles with Potent Antileishmanial Activity. **Future Microbiology**, v. 16, n. 12, p. 871–877, 28 ago. 2021.

MITTLER, R. ROS Are Good. **Trends in Plant Science**, 22(1), 11–19. 2017.

MITTRA, B. et al. The iron-dependent mitochondrial superoxide dismutase SODA promotes *Leishmania* virulence. **Journal of Biological Chemistry**, v. 292, n. 29, p. 12324–12338, jul. 2017.

MITTRA, B.; ANDREWS, N. W. IRONy OF FATE: role of iron-mediated ROS in *Leishmania* differentiation. **Trends in Parasitology**, v. 29, n. 10, p. 489–496, out. 2013.

Moraes LS, Galué-Parra AJ, Hage AAP, Moura HA, Garcia MSA, Macêdo CG, Rodrigues APD, Guilhon GMSP, Silva EOD. In Vitro Leishmanicidal Activity of Copaiba Oil and Kojic Acid Combination on the Protozoan *Leishmania* (*Leishmania*) amazonensis and Host Cell. **Microorganisms**. 2023 Dec 5;11(12):2925..

MORAES, L. S. DE et al. In Vitro Leishmanicidal Activity of Copaiba Oil and Kojic Acid Combination on the Protozoan *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* and Host Cell. **Microorganisms**, v. 11, n. 12, p. 2925, 1 dez. 2023.

NAIR, Arathi et al. Conceptual evolution of cell signaling. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 20, n. 13, p. 3292, 2019.

NAKAI, K., & TSURUTA, D. What Are Reactive Oxygen Species, Free Radicals, and Oxidative Stress in Skin Diseases? **International Journal of Molecular Sciences**, 22(19), 10799. 2021.

NISIMOTO, Yukio et al. Nox4: a hydrogen peroxide-generating oxygen sensor. **Biochemistry**, v. 53, n. 31, p. 5111-5120, 2014.

OH, Eun Bee et al. NADPH oxidase 1/4 dual inhibitor setanaxib suppresses platelet activation and thrombus formation. **Life Sciences**, v. 357, p. 123061, 2024.

OSORIO Y FORTÉA, J., PRINA, E., DE LA LLAVE, E., LECOEUR, H., LANG, T., & MILON, G. Unveiling pathways used by *Leishmania amazonensis* amastigotes to subvert macrophage function. **Immunological Reviews**, 219(1), 66–74. 2007.

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

PAHO/OMS. Leishmaniose. Disponível em: https://www.paho.org/pt/topicos/leishmaniose. Acesso em 20 abr. 2024.

PALUMBO, E. Oral miltefosine treatment in children with visceral leishmaniasis: a brief review. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, 12(1). 2008.

PAUL, R. et al. *Leishmania major*-induced alteration of host cellular and systemic copper homeostasis drives the fate of infection. **Communications Biology**, v. 7, n. 1, p. 1226, 30 set. 2024.

PINART, M. et al. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, v. 2020, n. 8, 27 ago. 2020.

PONTE-SUCRE, A., GAMARRO, F., DUJARDIN, J. C., BARRETT, M. P., LÓPEZ-VÉLEZ, R., GARCÍA-HERNÁNDEZ, R., POUNTAIN, A. W., MWENECHANYA, R., & PAPADOPOULOU, B. Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, 11(12), 1–24. 2017.

PRATT, Rebecca D. et al. The Na/K-ATPase signaling: from specific ligands to general reactive oxygen species. **International journal of molecular sciences**, v. 19, n. 9, p. 2600, 2018.

R BUETTNER, Garry. Superoxide dismutase in redox biology: the roles of superoxide and hydrogen peroxide. **Anti-Cancer Agents in Medicinal Chemistry (Formerly Current Medicinal Chemistry-Anti-Cancer Agents)**, v. 11, n. 4, p. 341-346, 2011.

RAIMUNDO, V. D. et al. Effects of terpenes in the treatment of visceral leishmaniasis: A systematic review of preclinical evidence. **Pharmacological Research**, v. 177, p. 106117, 1 mar. 2022.

REIS, J., MASSARI, M., MARCHESE, S., CECCON, M., AALBERS, F. S., CORANA, F., VALENTE, S., MAI, A., MAGNANI, F., & MATTEVI, A. A closer look into NADPH oxidase inhibitors: Validation and insight into their mechanism of action. **Redox Biology**, 32, 101466. 2020.

REITHINGER, R., DUJARDIN, J.-C., LOUZIR, H., PIRMEZ, C., ALEXANDER, B., & BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, 7(9), 581–596. 2007.

ROCCO-MACHADO, N., COSENTINO-GOMES, D., & MEYER-FERNANDES, J. R. Modulation of Na+/K+ ATPase activity by hydrogen peroxide generated through heme in *L. amazonensis*. **PLoS ONE**, 10(6), 1–15. 2015.

ROCCO-MACHADO, N., COSENTINO-GOMES, D., NASCIMENTO, M. T., PAES-VIEIRA, L., KHAN, Y. A., MITTRA, B., ANDREWS, N. W., & MEYER-FERNANDES, J. R. *Leishmania amazonensis* ferric iron reductase (LFR1) is a bifunctional enzyme: Unveiling a NADPH oxidase activity. **Free Radical Biology and Medicine**, 143(August), 341–353. 2019.

ROCHA, M. I. F. et al. Mortalidade por doenças tropicais negligenciadas no Brasil no século XXI: análise de tendências espaciais e temporais e fatores associados. **Revista Panamericana de Salud Pública**, v. 47, p. 1, 24 out. 2023.

SALVADOR, E. L., & RICA, C. Informe epidemiológico das Américas. 2023.

SIES, H. Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: Oxidative eustress. **Redox Biology**, 11(January), 613–619. 2017.

SIES, H., & JONES, D. P.. Reactive oxygen species (ROS) as pleiotropic physiological signalling agents. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, 21(7), 363–383. 2020.

SILVEIRA, F. T. What makes mucosal and anergic diffuse cutaneous leishmaniases so clinically and immunopathogically different? A review in Brazil. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 113, n. 9, p. 505–516, 6 set. 2019.

SUMIMOTO, H. Structure, regulation and evolution of NOX-family NADPH oxidases that produce reactive oxygen species. **FEBS Journal**, 275(13), 3249–3277. 2008;

SYLVESTER, Anthony L. et al. Inhibiting NADPH oxidases to target vascular and other pathologies: an update on recent experimental and clinical studies. **Biomolecules**, v. 12, n. 6, p. 823, 2022.

TANG, Chao Tao; GAO, Yun Jie; GE, Zhi Zheng. NOX4, a new genetic target for anti-cancer therapy in digestive system cancer. **Journal of digestive diseases**, v. 19, n. 10, p. 578-585, 2018.

TASLIMI, Y., ZAHEDIFARD, F., & RAFATI, S. Leishmaniasis and various immunotherapeutic approaches. **Parasitology**, 145(4), 497–507. 2018.

TAYLOR, J. P., & TSE, H. M. The role of NADPH oxidases in infectious and inflammatory diseases. **Redox Biology**, 48, 102159. 2021.

TEGEGNE, B.; ALEMU, G. Progress of Mucocutaneous Leishmaniasis to Drug Nonresponsive Diffuse Cutaneous Leishmaniasis in Ethiopia. A Case Report. **International Medical Case Reports Journal**, v. Volume 13, p. 551–555, out. 2020.

TEIXEIRA, G. et al. Therapeutic potential of NADPH oxidase 1/4 inhibitors. **British journal of pharmacology**, v. 174, n. 12, p. 1647-1669, 2017.

TEN FREYHAUS, Henrik et al. Novel Nox inhibitor VAS2870 attenuates PDGF-dependent smooth muscle cell chemotaxis, but not proliferation. **Cardiovascular research**, v. 71, n. 2, p. 331-341, 2006.

THANNICKAL, V. J., & FANBURG, B. L. Reactive oxygen species in cell signaling. **American Journal of Physiology-Lung Cellular and Molecular Physiology**, 279(6), L1005–L1028. 2000.

TOM, A. et al. Interactions between *Leishmania* parasite and sandfly: a review. **Parasitology Research**, v. 123, n. 1, p. 6, 6 jan. 2024.

TOMÁS AM, CASTRO H. Redox metabolism in mitochondria of trypanosomatids. **Antioxid Redox Signal**.;19(7):696-707. 2013.

TOMÁS, Ana M.; CASTRO, Helena. Redox metabolism in mitochondria of trypanosomatids. **Antioxidants & redox signaling**, v. 19, n. 7, p. 696-707, 2013.

TORRES-GUERRERO, E., QUINTANILLA-CEDILLO, M. R., RUIZ-ESMENJAUD, J., & ARENAS, R. Leishmaniasis: a review. **F1000Research**, 6, 750. 2017.

TSIGANKOV, Polina et al. Phosphoproteomic analysis of differentiating Leishmania parasites reveals a unique stage-specific phosphorylation motif. **Journal of proteome research**, v. 12, n. 7, p. 3405-3412, 2013.

ULIANA, S. R. B., TRINCONI, C. T., & COELHO, A. C. Chemotherapy of leishmaniasis: Present challenges. **Parasitology**, 145(4), 464–480. 2018.

VAN ASSCHE, T. et al. *Leishmania*–macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 2, p. 337–351, jul. 2011.

VAN GRIENSVEN, J., & DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**, 26(2), 309–322. 2012.

VAN GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis**. Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 309–322, 2012.

VELEZ, R.; GÁLLEGO, M. Commercially approved vaccines for canine leishmaniosis: a review of available data on their safety and efficacy. **Tropical Medicine & International Health**, v. 25, n. 5, p. 540–557, 2 maio 2020.

VOLPEDO, G. et al. Mechanisms of Immunopathogenesis in Cutaneous Leishmaniasis And Post Kala-azar Dermal Leishmaniasis (PKDL). **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 11, 8 jun. 2021.

VOTYAKOVA, Tatyana V.; REYNOLDS, Ian J. Detection of hydrogen peroxide with Amplex Red: interference by NADH and reduced glutathione auto-oxidation. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 431, n. 1, p. 138-144, 2004.

WAGHELA, Bhargav N. et al. Molecular insights of NADPH oxidases and its pathological consequences. **Cell biochemistry and function**, v. 39, n. 2, p. 218-234, 2021.

WHO. (2024). Leishmaniasis. Disponível em: https://www.who.int/health-topics/leishmaniasis#tab=tab_1. Acesso em 12 mai. 2024.

WHO. (2024). Status of cutaneous leishmaniosis (CL) worldwide, 2022. Disponível em: https://www.who.int/images/defaultsource/maps/leishmaniasis_vl_2022.png?sfvrsn=57d2c12f_3. Acesso 20 abr. 2024.

WILSON, M. E., LEWIS, T. S., MILLER, M. A., MCCORMICK, M. L., & BRITIGAN, B. E. *Leishmania chagasi*: Uptake of iron bound to lactoferrin or transferrin requires an iron reductase. **Experimental Parasitology**, 100(3), 196–207. 2002.

WIND, Sven et al. Comparative pharmacology of chemically distinct NADPH oxidase inhibitors. **British journal of pharmacology**, v. 161, n. 4, p. 885-898, 2010.

WINGLER, K., ALTENHOEFER, S. A., KLEIKERS, P. W. M., RADERMACHER, K. A., KLEINSCHNITZ, C., & SCHMIDT, H. H. H. W. VAS2870 is a pan-NADPH oxidase inhibitor. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 69(18), 3159–3160. 2012.

WINGLER, Kirstin et al. VAS2870 is a pan-NADPH oxidase inhibitor. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 69, p. 3159-3160, 2012.

YANG, B., CHEN, Y., & SHI, J. Reactive Oxygen Species (ROS)-Based Nanomedicine. **Chemical Reviews**, 119(8), 4881–4985. 2019.

YANG, S., & LIAN, G. ROS and diseases: role in metabolism and energy supply. **Molecular and Cellular Biochemistry**, 467(1–2), 1–12. 2020.

ZHANG, H. et al. Progress in antileishmanial drugs: Mechanisms, challenges, and prospects. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 19, n. 1, p. e0012735, 3 jan. 2025.

ZHANG, X., KRAUSE, K. H., XENARIOS, I., SOLDATI, T., & BOECKMANN, B. Evolution of the Ferric Reductase Domain (FRD) Superfamily: Modularity, Functional Diversification, and Signature Motifs. **PLoS ONE**, 8(3). 2013.

ZHANG, Y., MURUGESAN, P., HUANG, K., & CAI, H. NADPH oxidases and oxidase crosstalk in cardiovascular diseases: novel therapeutic targets. **Nature Reviews Cardiology**, 17(3), 170–194. 2020.

ZHENG, Hui et al. Setanaxib (GKT137831) ameliorates doxorubicin-induced cardiotoxicity by inhibiting the NOX1/NOX4/reactive oxygen species/MAPK pathway. **Frontiers in pharmacology**, v. 13, p. 823975, 2022.