



**UNIVERSIDADE FEDERAL RURAL DE PERNAMBUCO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM DESENVOLVIMENTO E
INOVAÇÃO TECNOLÓGICA EM MEDICAMENTOS**

**ANÁLISE DE NOVOS PROTÓTIPOS LEISHMANICIDAS:
INIBIÇÃO SELETIVA DE TOPOISOMERASE DE *Leishmania* sp.
POR SUBSTÂNCIAS NATURAIS E SEMISSINTÉTICAS.**

**RECIFE
2017**

GIANI MARIA CAVALCANTE

**ANÁLISE DE NOVOS PROTÓTIPOS LEISHMANICIDAS:
INIBIÇÃO SELETIVA DE TOPOISOMERASE DE *Leishmania* sp.
POR SUBSTÂNCIAS NATURAIS E SEMISSINTÉTICAS.**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como requisito para obtenção do título de Doutora em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos.

Orientação: Profa. Dra. Tania Maria Sarmiento da Silva.

Coorientação: Profa. Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira

RECIFE
2017

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema Integrado de Bibliotecas da UFRPE
Biblioteca Central, Recife-PE, Brasil

C376a Cavalcante, Giani Maria

Análise de novos protótipos leishmanicidas: inibição seletiva de topoisomerase de *Leishmania* sp. por substâncias naturais e semissintéticas./ Giani Maria Cavalcante. – 2017.

179 f. : il.

Orientadora: Tania Maria Sarmento da Silva.

Coorientadora: Magna Suzana Alexandre Moreira.

Tese (Doutorado) – Universidade Federal Rural de Pernambuco, Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos, Recife, BR-PE, 2017.

Inclui referências e anexo(s).

1. Leishmaniose 2. Doença negligenciada 3. Produtos naturais
I. Silva, Tania Maria Sarmento da, orient. II. Moreira, Magna Suzana Alexandre, coorient. III. Título

CDD 615.19

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos da Universidade Federal Rural de Pernambuco, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Grau de Doutor em Desenvolvimento e Inovação Tecnológica em Medicamentos.

“Análise de novos protótipos para o tratamento da leishmaniose: inibição seletiva de topoisomerase de *Leishmania* spp. por substâncias naturais e semissintéticas”

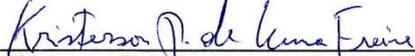
por

GIANI MARIA CAVALCANTE

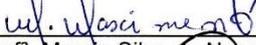
APROVADA EM: 26.05.2017.

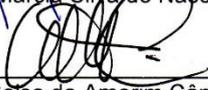
BANCA EXAMINADORA


Profª Tânia Maria Sarmiento da Silva - DQ/UFRPE (Orientadora)


Prof. Kristerson Reinaldo de Luna Freire - UFPB


Profª. Maria Bernadete S. Mala – UFPE


Profª. Marcia Silva do Nascimento - UFPE


Prof. Celso de Amorim Câmara – DQ/UFRPE


Coordenação PPGDITM/UFRPE

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho:

Aos meus pais Genário Estrela (*in memoriam*) e Gracinda Maria, pelos ensinamentos, pela educação pautada no exemplo, pelo incentivo, pelo apoio e por todo amor.

As minhas irmãs, Giovana e Gracilda, por serem meus exemplos de vida pessoal e profissional, pelo apoio, pelo incentivo, e pelo carinho de sempre.

AGRADECIMENTOS

A profa. Tânia Sarmiento por generosamente compartilhar comigo seu conhecimento e know-how em Química de Produtos Naturais, através da sua orientação, atenção e disponibilidade.

À profa. Magna Suzana por me integrar a sua equipe e colaborar para a conclusão deste trabalho.

Ao Dr. Rafael Balaña-Fouce e a Dra. Rosa Reguera pela excelente orientação nos ensaios de Parasitologia Molecular, por compartilhar comigo seu conhecimento com tanto entusiasmo e dedicação e por me mostrar a beleza e a espetacular face molecular das leishmanias.

Ao Dr. Celso Amorim Câmara pela colaboração para realização desta pesquisa.

A Banca examinadora pelo aceite em participar e pelas sugestões vindouras.

As Dras. Aline Cavalcanti, Vanessa Muller e Yolanda Pérez, por contribuírem significativamente com os ensaios moleculares envolvendo TopIB e TopIB recombinante de *Leishmania* spp.

A equipe do BIOFITO/UFRPE pelo acolhimento, pela agradável convivência, pelos ensinamentos e principalmente pelos “salvamentos químicos!” Agradeço de forma especial a Dário, Débora, Geane, Girliane, Tamires e Telma.

À equipe do LAFI/UFAL, sem exceção, pelo acolhimento, ensinamentos, disponibilidade e agradável convivência. Muito obrigada a todos os **LaFianos**, sem citar nomes, afinal de contas vocês são muitos e não quero correr o risco de esquecer alguém.

À equipe do INTOXI/UNILEON, pelo acolhimento, ensinamento, agradável convivência e pela troca de experiência e conhecimento internacional. Obrigada Steves, Raquel, Irene, Ana, Camiño, Esmeralda, Estefania e Marzia.

À Universidad de León por permitir a realização do estágio doutoral em suas dependências.

À CAPES pela concessão da bolsa de Doutorado.

AO CNPq pela concessão da bolsa de Doutorado Sanduíche e financiamento dos projetos atrelados a essa tese.

À FACEPE pelos financiamentos de projetos atrelados a essa tese (PRONEM-AP-0741106/2014)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Morfologia das espécies do gênero *Leishmania* sp. (A) formas amastigotas; (B) formas promastigotas; (C) Representação esquemática das formas promastigotas (esquerda) e amastigotas (direita), evidenciando as principais organelas intracelulares.

Figura 2 – Agrupamento das espécies de *Leishmania* pela análise de espectros MS/MALDI-TOF. (A) Distância taxonômica das espécies; (B) Agrupamento de acordo com a presença e ausência de picos e algoritmos de interpretação.

Figura 3 – Ciclo vital de *Leishmania* sp. Na cor vermelha são apresentados os acontecimentos desenvolvidos no interior do inseto vetor, enquanto na cor azul são apresentados os acontecimentos desenvolvidos no hospedeiro mamífero.

Figura 4 – Fêmea da espécie *Lutzomyia longipalpis* mosquito transmissor das leishmanioses nos países do novo mundo.

Figura 5 – Manifestações clínicas das leishmanioses. (A) Leishmaniose cutânea. (B) Leishmaniose mucocutânea. (C) Leishmaniose Visceral

Figura 6 – Distribuição epidemiológica mundial dos casos de leishmaniose a ano de 2012. (A) Leishmaniose tegumentar; (B) leishmaniose visceral.

Figura 7: Mapa da distribuição geográfica da infecção por leishmaniose (cinza claro); e de coinfeção AIDS-leishmaniose (cinza escuro).

Figura 8 – Resposta imune do hospedeiro vertebrado a *Leishmania* sp.

Figura 9 – Estruturas químicas de antimoniais pentavalentes. (A) Estibogluconato de sódio; (B) Antimoniato de *N*-metilglucamina

Figura 10 – Estrutura química da pentamidina.

Figura 11 – Estrutura química da anfotericina B

Figura 12 – Estrutura química da mitelfosina.

Figura 13 – Estrutura química da paromicina.

Figura 14 – Estruturas de alcaloides com potencial atividade leishmanicida.

Figura 15 – Estruturas de flavonoides com potencial atividade leishmanicida.

Figura 16 – Estruturas de terpenoides com potencial atividade leishmanicida.

Figura 17 – Estruturas de quinonas com potencial atividade leishmanicida.

Figura 18 – Fotografia de microscopia eletrônica dos estados topológicos do DNA. (A) estado topológico superenovelado; (B) estado topológico relaxado.

Figura 19 – Modelo ilustrativo da estrutura toroidal (A) e da estrutura plectonêmica (B).

Figura 20 – Modelo ilustrativo de formação de (A) R-loops e (B) D-loops durante o processo de replicação do DNA.

Figura 21 – Diferenças estruturais entre TopI de *Leishmania* sp. e TopI humana.

Figura 22 – Diferenças estruturais entre TopII humana e TopII de *Leishmania* sp.

Figura 23 – Diferenças estruturais entre LdTopIB subunidade larga (LdTopIL) e subunidade pequena (LdTopIS).

Figura 24 – Camptotecina (CPT) e alguns de seus análogos aprovados para uso clínico (A) e em fase clínica (B).

Figura 25 – Ação da camptotecina e seus derivados sobre DNA.

Figura 26 – Estruturas de substâncias com potencial atividade inibidora sobre enzima topoisomerase de *Leishmania* sp.

Figura 27– Distribuição de EEtOH, FrHex, FrAcEOt, FrMeOH, naringenina e isoramnetina da própolis e das substâncias controles, em placas de 96 poços para realização do ensaio de viabilidade celular em Macrófagos.

Figura 28 – UPLC-DAD (340 nm) da fração de AcOEt da própolis (A). Cromatograma dos íons base (B) obtido por MSE (UPLC-qTOF / MSE) em modo negativo.

Figura 29 – Espectro de ESI-MS/MS para a Quercetina-dimetil éter (9).

Figura 30 – Espectro de ESI-MS/MS para a Apigenina metil éter (20).

Figura 31 – Espectro de ESI-MS/MS para a Isosakuranetina (19).

Figura 32 – Espectro de ESI-MS/MS para a Dihidroxi-dimetoxi-chalcona (24)

Figura 33 – Quantificação da atividade de LcTopIB para validação do extrato enzimático em ensaio de relaxamento do DNA superenovelado (plasmídeo pBR322) mediante diluições seriadas 1:2.

Figura 34 – Efeito da naringenina sobre as enzimas LcTopIB e hTopIB, utilizando o ensaio de relaxamento de DNA superenovelado.

Figura 35 – Efeito da isoramnetina sobre as enzimas LcTopIB e hTopIB, utilizando o ensaio de relaxamento de DNA superenovelado.

Figura 36 – Percentuais de inibição da atividade de LcTopIB pelos flavonoides naringenina e isoramnetina. (A) Análise comparativa dos percentuais de inibição da atividade de LcTopIB pelos flavonoides naringenina e isoramnetina. (B) Curva

dose-resposta da inibição da atividade de LcTopoIB pelos flavonoides naringenina para cálculo de CI_{50} .

Figura 37 – Alcamidas que ocorrem em diferentes gêneros de plantas.

Figura 38 – Alcamidas naturais, sintéticas e modificadas utilizadas nos ensaios biológicos e moleculares com *Leishmania* sp.

Figura 39 – Preparação dos cloretos a partir dos ácidos.

Figura 40 – Reação do composto protótipo 1.

Figura 41 – Distribuição das substâncias RAC e dos controles, em placas de 96 poços negras para realização do ensaio atividade leishmanicidas sobre formas promastigotas de *L. Infantum* iRFP70 (A) e dispositivo para captação de imagem ODYSSEY® (B).

Figura 42 – Imagem de uma placa de 384 poços registrada pelo dispositivo ODYSSEY®

Figura 43 – Plasmídeo pESC-Ura com a inserção das subunidades LdTopL e LdTopS (A) e subunidade hTop1 (B)

Figura 44 – Kit QIAquick™ para extração de DNA. (A) embalagem do Gel Extraction Kit. (B) Sequencia do método de extração de DNA, conforme recomendação do fabricante.

Figura 45– Modo de confirmação da ligação dos fragmentos das sequências de TopoIB recombinantes no plasmídeo intermediário (*E. Coli*). Colônias com coloração branca correspondem a inserção positiva; colônias com coloração azul correspondem a inserção negativa.

Figura 46 – Coluna cromatográfica preenchida com a resina Heparina Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare®), usada para purificação de TopoIB recombinante.

Figura 47 – Clonagem dos genes *LdTopIL* e *LdTopIS* e hTop1. (A) Gel de agarose mostrando os tamanhos obtidos para os produtos da digestão do vetor pESC-wt com os pares de enzimas *BamHI/XhoI* e *NotI/SpeI*, correspondentes aos genes *LdTopIL* e *LdTopIS*. (B) Gel de agarose mostrando os tamanhos obtidos para os produtos da digestão do vetor pESC-URA com o par correspondente ao gene hTop1.

Figura 48 – Comprovação da purificação das enzimas LdTopIB e hTop1 expressas em leveduras *S. cerevisiae* EKY3 e *S. cerevisiae* MBY3, respectivamente. (A) Frações mais ativas de LdTopIB nos ensaios de relaxamento de DNA superenovelado. (B) Frações mais ativas de hTop1 nos ensaios de relaxamento de DNA superenovelado.

Figura 49 – Quantificação da atividade de relaxamento do DNA superenovelado mediante diluições seriadas 1/3.

Figura 50 – Inibição da atividade de LdTopIB, mediante relaxamento do DNA superenovelado, pelas substâncias RAC 1-16 em presença de 1U de LdTopIB incubada com 100 µM de cada substância e 0,5 µg de plasmídeo psK em diferentes tempos (5, 10 e 30 minutos) a 37 °C. (A) RAC 1 – 4; (B) RAC 5 – 8; (C) RAC 9 – 12; (D) RAC 13 – 16.

Figura 51 – Inibição da atividade de hTop1 mediante relaxamento do DNA superenovelado, pelas substâncias RAC 1-16 em presença de 1U de LdTopIB incubada com 100 µM de cada substância e 0,5 µg de plasmídeo psK em diferentes tempos (5, 10 e 30 minutos) a 37 °C. (A) RAC 1 – 4; (B) RAC 5 – 8; (C) RAC 9 – 12; (D) RAC 13 – 16.

Figura 52 – Inibição da atividade de LdTopIB e hTop1 mediante relaxamento do DNA superenovelado, pelas substâncias RAC4, RAC8, RAC9, RAC12, RAC13 e RAC16. em presença de 1U de LdTopIB incubada com diferentes concentrações de cada substância e 0,5 µg de plasmídeo psK em diferentes tempos a 37 °C. (A) RAC4; (B) RAC8; (C) RAC9; (D) RAC12; (E) RAC13 e (F) RAC16.

Figura 53 – Curva-dose resposta e determinação da concentração inibitória mínima (CI_{50}) do efeito inibitório das RAC4, RAC8, RAC9, RAC12, RAC13 e RAC16 sob a atividade da LdTopIB. (A) RAC4; (B) RAC8; (C) RAC9; (D) RAC12; (E) RAC13; (F) RAC16.

Figura 54 – Detecção de complexos de clivagem (CL) em presença de um plasmídeo superenovelado (psK) sob a atividade catalítica da LdTopIB pelas substâncias RAC4, RAC8, RAC9, RAC12, RAC13 e RAC16, comparando ao efeito do fármaco camptotecina. (A) RAC4; (B) RAC8; (C) RAC9; (D) RAC12; (E) RAC13 e (F) RAC16.

Figura 55 – Detecção de complexos de clivagem (CL) em presença de um plasmídeo superenovelado (psK) sob a atividade catalítica da LdTopIB pelas substâncias RAC4, RAC8, RAC9, RAC12, e RAC16, em diferentes concentrações, em 30 minutos a 37 °C, comparando ao efeito do fármaco camptotecina. (A) RAC4 e RAC8; (B) RAC9 e RAC12 e (C) RAC16.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Nomenclatura para *Leishmania* sp. baseada na sequência do gene *hsp70*.

Tabela 2 – Formas clínicas das leishmanioses e seus agentes etiológicos

Tabela 3 – Características e diferenças entre as quatro famílias da enzima topoisomerase.

Tabela 4 – Flavonoides identificados por UPLC-DAD-ESI(-)-QTOF-MS/MS na fração AcOEt da própolis.

Tabela 5 – Efeitos do EEtOH, FrHex, FrAcEOt, FrMeOH, naringenina e isoramnetina da própolis sobre a viabilidade celular de macrófagos da linhagem J774 através do ensaio de MTT.

Tabela 6 – Efeitos do EEtOH, das frações FrHex, FrAcEOt, FrMeOH e dos flavonoides naringenina e isoramnetina sob formas promastigotas de *L. amazonenses*.

Tabela 7 – Efeitos do EEtOH, das frações FrHex, FrAcEOt, FrMeOH e dos flavonoides naringenina e isoramnetina sob formas promastigotas de *L. chagasi*.

Tabela 8 – Efeitos do EEtOH, das frações FrHex, FrAcEOt, FrMeOH e dos flavonoides naringenina e isoramnetina sob formas amastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*.

Tabela 9 – Efeito das substâncias RAC 1-16 sobre a viabilidade celular de macrófagos da linhagem J774 no ensaio de MTT após 48 horas.

Tabela 10 – Efeitos das substâncias RAC 1-16 sobre a viabilidade de formas promastigotas de *L. amazonensis* após 48 horas de tratamento.

Tabela 11– Efeitos das substâncias RAC 1-16 sobre a viabilidade de formas promastigotas de *L. chagasi* após 48 horas de tratamento.

Tabela 12 – Efeitos das substâncias RAC 1-16 sobre a viabilidade de formas amastigotas de *L. amazonensis* após 48 horas de tratamento.

Tabela 13 – Efeitos das substâncias RAC 1-16 sobre a viabilidade de formas amastigotas de *L. chagasi* após 48 horas de tratamento.

Tabela 14 – Diferenças no efeito leishmanicida exercido pelas substâncias RAC9 e RAC13 sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*.

Tabela 15 - Efeito das substâncias RAC 1-16 e da Anfotericina B sobre a viabilidade de formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania infantum* após 48 horas de tratamento.

Tabela 16 – Atividades inibidoras comparativas das substâncias RAC sobre LdTopIB e hTopIB em função do tempo.

Tabela 17 – Atividades inibidoras comparativas das substâncias RAC sobre LdTopIB e hTopIB em função da concentração.

LISTA DE ABREVIACOES

AIDS – Sindrome da Imuno Deficiência Adquirida
ANOVA – Análise de variância
ATP – Adenosina Tri Fosfato
BOD – Demanda Bioquímica de Oxignio
BSA – Albumina Soro Bovino
C3b – Proteína do Complemento 3b
C3bi – Proteína do Complemento 3bi
CCDA – Cromatografia em Camada Delgada
CCR7 – Receptores para quimiocinas 77
CD80 – Células Dendríticas 80
CD86 – Células Dendríticas 86
CI50 – Concentrao Inibitória de 50%
CL – Complexo de Clivagem
CL₅₀ – Concentrao Letal 50%
CPT – Camptotecina
CR1 – Receptor de Complemento 1
CR3 – Receptor de complemento 3
DHFR – Dihidrofolato redutase timidilato sintase
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – cido Desoxirribonucleico
DP – Desvio Padrão
DTN – Doença Tropical Negligenciada
EDTA – cido Etilenodiamino Tetra-acético
EEtOH – Extrato Etanólico
EM – Efeito Máximo
EtBr – Brometo de Etídeo
EtOH – Etanol
FAD – Dissulfeto oxireductase
FrAcEOt – Frao Acetato de Etila
FrHEx – Frao Hexânica
FrMeOH – Frao Metanlica
GP63 – Glicoproteína 63

GPI – Glicosilfosfatilinositol
HIV – Vírus da imunodeficiência humana
hTop1 – Topoisomerase humana
HTS – Plataforma de alto rendimento
IL-10 – Interleucina-10
IL-12 – Interleucina-12
IL-13 – Interleucina-13
IL-1 β – Interleucina 1 β
IL-6 – Interleucina-6
INF- γ – Interferon- γ
iNOS – Óxido Nítrico Sintase
LdTopIL – Subunidade larga da topoisomerase de leishmania
LdTopIS – Subunidade pequena da topoisomerase de leishmania
LdTOPO – Topoisomerase recombinante
LPG – Lipofoglicano
LQM – Laboratório de Química Medicinal
LT – Leishmaniose Tegumentar
LV – Leishmaniose Visceral
M1 – Rota clássica da resposta imune
M2 – Rota alternativa da resposta imune
MTT – Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio
NA – Não Ativo
NAD – Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina oxidado
NADH – Dinucleotídeo de adenina nicotinamida reduzido
NE – Neutrófilos Elastase
NET – Rede Extracelular de Neutrófilos
NO – Óxido Nítrico
NT – Não Tóxico
O/N – Over Night
OMS – Organização Mundial da Saúde
Pb – pares de bases
pBR322 – Plasmídeo
PBS – Tampão fosfato-salino
PCR – Reação em cadeia de Polimerase

PEG – Polietilenoglenol
pESC-URA – plasmídeo
pH – Potencial de Hidrogênio
PIC – Coquetel Inibidor de Protease
PMSF – Floureto FenilMetilSofonil
RNA – Ácido Ribonucleico
ROS – Espécies Reativas de Oxigênio
rpm – Rotações por minuto
Sb(III) – Antimônio trivalente
Sb(V) – Antimônio pentavalente
SDS – Dodecil Sulfato de Sódio
SFB – Soro Fetal Bovino
TAE – Tris-Acetato-EDTA
TBE – Tris-Borato- EDTA
Th1 – Linfócitos T helper 1
Th2 – Linfócito T helper 2
TNF- α – Fator de Necrose Tumoral- α
TopI – Topoisomerase I
TopIB – Topoisomerase IB
TopII- Topoisomerase II

RESUMO

Avaliação do efeito leishmanicida de substâncias naturais e semissintéticas via inibição de topoisomerase de *Leishmania* sp.

A leishmaniose é uma das mais importantes doenças tropicais negligenciadas em termo de escobertas e desenvolvimento de fármacos. Além disso, a quimioterapia usada para tratar esta doença provou ser altamente tóxica. O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito leishmanicida de derivados da própolis coletada na região semiárida da Bahia e uma série de alcanidas naturais, sintéticas e modificadas, bem como, avaliar a ação destes sobre a atividade enzimática de topoisomerase de *Leishmania* e humana. O estudo químico da própolis foi realizado através da análise por espectrometria de massas de alta resolução; e as alcanidas foram obtidas a partir das reações de preparação de cloreto de ácidos, de preparação das amidas a partir de cloreto de ácido e amina e da aminólise da feniletilamina com o *p*-hidroxi-cinamato de metila. Os efeitos citotóxicos foram avaliados em macrófagos J774, através do ensaio de MTT. O efeito inibidor, a partir de ensaios *in vitro*, sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* foram avaliados através do ensaio de MTT e do ensaio de células J774 infectadas com formas promastigotas destas espécies, respectivamente. O efeito inibidor sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum* iFRP70 foi avaliado através da capacidade de emissão de luz infravermelha pelas cepas marcadas pela proteína iFRP70. A inibição da atividade da enzima topoisomerase foi avaliada através do relaxamento do DNA superenovelado, após análise de eletroforese em gel de agarose. A formação de complexo de clivagem foi avaliada através da capacidade de manutenção do corte na fita de DNA ao longo 30 minutos, após análise de eletroforese em gel de agarose. O extrato etanólico, as frações hexânica, acetato de etila e metanólica da própolis, bem como os flavonoides naringenina e isoramnetina, não apresentaram efeitos deletérios sobre as células J774 até a máxima concentração testada (100 µM). Das 16 alcanidas testadas, apenas três apresentaram efeitos deletérios sobre as células J774 a partir da concentração de 10 µM. A fração acetato afetou o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*, com percentuais de efeito máximo, na concentração de 10 µM, iguais a 82,2% e 75,5%, respectivamente, valores significativos quando comparados ao fármaco pentamidina. Os flavonoides naringenina e isoramnetina também afetaram significativamente o crescimento de formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*. Estes flavonoides afetaram a atividade enzimática da topoisomerase de leishmania, interferindo na capacidade da enzima em relaxar o DNA superenovelado, formado durante o processo de replicação de DNA. Os mesmos flavonoides não foram capazes de interferir na atividade enzimática da topoisomerase humana. Em relação as alcanidas testadas, àquelas denominadas RAC4, RAC8, RAC9, RAC12 e RAC16, apresentaram um efeito significativo contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. infantum* iFRP70, com concentração inibitória de 50% (CI₅₀) abaixo de 10 µM, efeito máximo acima de 60%. Estas alcanidas, quando testadas em concentrações variando de 100 a 3,15 µM µM, inibiram a capacidade da topoisomerase de leishmania em relaxar o DNA superenovelado, interferindo de forma significativa na atividade enzimática, com destaque para a RAC8 que foi capaz de inibir a atividade a partir de 6,25 µM, menor concentração inibitória observada. Estas alcanidas não inibiram a atividade enzimática da topoisomerase humana, em nenhuma das concentrações testadas, garantido a inibição seletiva da DNA topoisomerase de leishmania. Quando avaliada a capacidade de formação de complexo de clivagem, as alcanidas RAC4, RAC8, RAC9, RAC12 e RAC16, foram capazes de manter a estabilidade de formação do complexo de clivagem, mantendo o DNA cortado ao longo de 30 minutos. Dessa forma, esse trabalho demonstrou que as substâncias naturais e semissintéticas, apresentaram um efeito leishmanicida contra *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. infantum* iFRP70, bem como inibiram, de forma seletiva a atividade catalítica da enzima DNA topoisomerase de leishmania, podendo vir a ser utilizado como protótipo para o desenvolvimento de novos fármacos leishmanicidas.

Palavras-chaves: Leishmaniose. Doença negligenciada. Antileishmania. Própolis. Alcanidas

ABSTRACT

Evaluation of the leishmanicidal effect of natural and semisynthetic substances by inhibition of topoisomerase of *Leishmania* sp.

Leishmaniasis is one of the most important neglected tropical diseases in terms of drug discovery and development. Furthermore, the chemotherapy used to treat this disease has been proved to be highly toxic. The aim of this work was to evaluate the leishmanicidal effect of propolis derivatives collected in the semi-arid region of Bahia and a series of natural and semisynthetic alkalamides, as well to evaluate the action of these on the enzymatic activity of *Leishmania* and human DNA topoisomerase. The chemical study of propolis was carried by high resolution mass spectrometry analysis; and alkalamides were obtained from the acid chloride preparation reactions, the preparation of the amides from the acid chloride and the amine reactions, and the aminolysis of the phenylethylamine with the methyl *p*-hydroxycinnamate reactions. The cytotoxic effects were assessed on macrophages J774 by MTT assays. The inhibitory effect, *in vitro* assays, on promastigote and amastigote forms of *L. amazonensis* and *L. chagasi* were evaluated by MTT assay and cell J774 infected with promastigotes forms of these species assay, respectively. The inhibitory effect on promastigote and amastigote forms of *L. infantum* iFRP70 was assessed by the capacity of infrared light emission by strains iFRP70. The inhibition of topoisomerase activity was assessed by DNA supercoiled relaxation assay. Cleavage complex formation was assessed by the capacity to maintain the cleavage in the DNA strand over 30 minutes. The ethanolic extract, the hexane, ethyl acetate and methanolic fractions of propolis, and flavonoids naringenin and isorhamnetin, did not present deleterious effects on the J774 cells until to the maximum concentration tested (100 μ M). These flavonoids affected the enzymatic activity of leishmania topoisomerase, interfering in the enzyme's capacity to relax the DNA supercoiled and did not affected the enzymatic activity of humana topoisomerase. The alkalamides tested, RAC4, RAC9, RAC9, RAC12 and RAC16 showed a significant effect against promastigotes and amastigotes forms of *L. amazonensis*, *L. chagasi* and *L. infantum* iFRP70, with a 50% inhibitory concentration (IC_{50}) below 10 μ M and maximum effect above 60%. These alkalamides tested at concentrations ranging from 100 to 3.15 μ M, inhibited the capacity of leishmania topoisomerase to DNA supercoiled significantly interfering in the enzymatic activity, especially RAC8 that was able to inhibit activity from 6.25 μ M, lower inhibitory concentration observed. These alkalamides did not inhibit the enzymatic activity of human topoisomerase. When evaluated the formation of cleavage complex, the RAC4, RAC8, RAC9, RAC12 and RAC16 were able to maintain the stability of the cleavage complex. Thus, this work demonstrated that the natural and semi-synthetic substances had a leishmanicidal effect against *L. amazonensis*, *L. chagasi* and *L. infantum* iFRP70, as well as selectively inhibited the catalytic activity of the enzyme DNA topoisomerase of leishmania, to be used as a prototype for the development of new leishmanicidal drugs.

Key-words: Leishmaniasis. Neglected disease. Antileishmania. Propolis. Alkamidas

SUMÁRIO

Apresentação	20
Revisão de Literatura	23
Referências Bibliográficas	71
Objetivos	90
Materiais e Métodos	92

CAPÍTULO I

Introdução	94
Materiais e Métodos	95
Resultados e Discussão	102
Conclusões	117
Referências Bibliográficas	118

CAPÍTULO II

Introdução	125
Materiais e Métodos	127
Resultados e Discussão	146
Conclusões	169
Referências Bibliográficas	170
Anexos	176

As doenças infecciosas representam graves problemas de saúde pública que afetam uma fração significativa da população mundial e, em razão de seu aspecto socioeconômico, representam um dos principais desafios para o século XXI (DOS SANTOS et al., 2014). Dentro desse grupo de doenças, destacam-se aquelas chamadas de tropicais negligenciadas (DTN), um grupo de doenças, cujas condições crônicas e debilitantes, causadas por infecções parasitárias, virais e bacterianas afetam milhões de pessoas nos países subdesenvolvidos, conforme afirma Zhang et al. (2010).

Enquadrada como doença tropical negligenciada, as leishmanioses destacam-se por seu caráter endêmico em 88 países, e uma incidência de 1,0 a 1,5 milhões de casos por ano (PLOURDE et al. 2012). A esta doença estão associados altos índices de mortalidade e morbidade, em virtude da sobrevivência do hospedeiro, que é garantida, entre outros aspectos, pela sua complexidade genética, o que dificulta o desenvolvimento de vacinas e fármacos eficazes para o tratamento dessas doenças.

Segundo Chakravarty e Sundar (2011), as opções de tratamento são limitadas e pouco eficazes, o que tem sido decorrente de casos de resistência do parasita. Por mais de 60 anos, o tratamento, tem se concentrado no uso de fármacos, que apresentam uma série de efeitos colaterais, além de um alto grau de toxicidade em virtude da longa exposição do paciente (DECUYPERE et. al., 2012).

Em virtude dessa resistência, as pesquisas por novos quimioterápicos são necessárias e, sobretudo urgente, uma vez que a resistência desenvolvida pelo parasita é vista como uma ameaça duradoura e que necessita ser minimizada, já que se trata de uma estratégia evolutiva do parasita (PLOURDE et al., 2012).

Assim, novas substâncias são testadas, quer seja em ensaios *in vitro* e/ou *in vivo*, com atenção especial as de origem natural e semissintética, uma vez que essas substâncias apresentam composição química, que em geral, minimiza o desenvolvimento de resistência por parte de microrganismos patogênicos (GIL et al., 2008).

De acordo com Grego et al. (2012), as pesquisas atuais devem investigar, além da atividade leishmanicidas, o mecanismo de ação das substâncias sobre vias metabólicas vitais e específicas do parasita, a fim de desvendar potenciais alvos quimioterápicos.

Dentre as investigações do mecanismo de ação de novas substâncias leishmanicidas, a ação destas substâncias sobre a atividade da enzima DNA topoisomerase tem sido otimizada. O interesse pela inibição dessa enzima deve-se a três fatores principais: (a) elucidação de mecanismos de ação, com o propósito de determinar a possibilidade dessa via ser utilizada como alvo quimioterápico, (b) devido ao fato dessa enzima ser um alvo bem sucedido e amplamente estudado na terapia do câncer; e (c) em razão da topoisomerase de tripanossomatídeos diferir significativamente da enzima homóloga em mamíferos, o que permitiria ação sob as células parasitárias e seleção das células hospedeiras (BALAÑA-FOUCE et al., 2014; CABALLEIRA et al., 2012; POMMIER, 2006).

Face ao panorama exposto, fica evidente a necessidade permanente de buscar opções terapêuticas, para o tratamento das leishmanioses através de testes com diferentes substâncias, cujos mecanismos de ação permitam que as células parasitas sejam mais sensíveis às suas ações do que as células dos humanos hospedeiros, conforme afirma Fraga et al. (2010). Incrementa-se ainda, a urgência na necessidade do desenvolvimento de novos fármacos, a partir de estudos de novas alternativas terapêuticas, que possam viabilizar o possível desenvolvimento de novos medicamentos úteis no tratamento da doença, representando assim inovação tecnológica no setor farmacêutico nacional.

Desta forma, este trabalho tem como proposta investigar a atividade leishmanicida de substâncias naturais, sintéticas e modificadas, em ensaios *in vitro* e *ex-vivo*, sobre formas promastigotas e amastigotas de diferentes espécies de leishmania, bem como avaliar as capacidades destas substâncias em inibir a atividade catalítica da enzima topoisomerase IB de *Leishmania* sp. e humana.

Este trabalho foi dividido em 2 capítulos, no capítulo I são apresentados os resultados decorrentes do estudo químico da própolis coletada na cidade de Casa Nova, Bahia, e os efeitos dos seus derivados sobre a viabilidade de macrófagos J774 e formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L.*

chagasi, bem como a ação destes derivados sobre a atividade catalítica da topoisomerase IB de *L. chagasi* e topoisomerase IB humana.

No capítulo II são apresentados os efeitos de uma série de alcamidas sintéticas e modificadas sobre a viabilidade de macrófagos J774 e formas promastigotas e amastigotas das espécies *L. amazonenses*, *L. chagasi* e *L. infantum* iFR70, bem como a ação destas substâncias sobre a atividade catalítica da topoisomerase IB recombinante de *Leishmania* sp. e humana.

1. Leishmania e Leishmanioses

1.1. Definição e contexto histórico das leishmanioses

Define-se leishmanioses como o conjunto de enfermidades zoonóticas causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, que afetam o ser humano e várias espécies de vertebrados superiores, causando lesão na pele, na mucosa e em órgãos internos, podendo ser mortal, quando não tratada (ASHFORD, 2000). Trata-se de uma doença emergente, com altos índices de morbidade e mortalidade nos países tropicais, subtropicais e Bacia do Mediterrâneo (DUTCHIE et al., 2012).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS) esta doença é classificada como uma Doença Tropical Negligenciada (DTN), uma vez que afeta milhões de pessoas ao redor do mundo, possui uma alta taxa de mortalidade, e recebe poucos recursos e atenção para sua erradicação (WHO, 2010). Dados da OMS informam que entre os anos de 2000 e 2011 apenas 0,08% de novos produtos registrados por essa instituição foram específicos para leishmanioses, apontando um desinteresse da indústria, no que concerne ao desenvolvimento de novos medicamentos e vacinas, para tratamento e erradicação da doença (PEDRIQUE et al., 2013).

Historicamente, acredita-se que as primeiras descrições para leishmaniose datam o século VII a.C. quando no velho mundo, na Biblioteca do Rei Assírio, no Iraque, foram encontradas referências sobre uma enfermidade conhecida como “botão do oriente”. Entretanto, em virtude de os sintomas serem semelhantes a outras doenças que circulavam na época (por exemplo, a malária), acredita-se que por muitos anos a leishmaniose foi diagnosticada como uma malária mais virulenta (COX, 2002).

Ao longo dos séculos, foram feitos registros de doenças cujos sintomas assemelhavam-se ao que hoje conhecemos como leishmaniose. Como um surto de uma doença desconhecida, em 1824 na Índia, que matou 75.000 pessoas em três anos, na qual as pessoas apresentavam escaras pelo corpo, principalmente no rosto (BERN; CHOWDHURY, 2006); e como a “enfermidades dos andes”,

registrada por Fernando Santillán em 1512, cuja principal característica era a presença de lesões na mucosa da boca e nariz (GADE, 1979).

Em 1898 foi feita a primeira descrição do agente causador da doença, cujo registro descreve a presença de um protozoário como o responsável pelas lesões da pele (COOK, 1993). Porém, somente no início do século XX, o médico escocês Willian Leishman e o pesquisador inglês Charles Donovan publicaram os primeiros relatos sobre o agente etiológico causador de leishmaniose (COOK, 1993). Desde então, vários estudos revelaram a morfologia e o ciclo de vida do parasita, a forma de transmissão da doença e suas manifestações clínicas, além de outros aspectos relevantes (KLLINCK-KENDRICK, 2013).

Nos últimos anos as pesquisas voltadas para leishmaniose estão incluindo resultados obtidos a partir do uso de metodologias aplicadas às áreas de Proteômica, Metabolômica e Engenharia Genética, objetivando aprimorar o seu tratamento, a partir do desenvolvimento de fármacos mais eficazes e vacinas para a erradicação da doença (KLLINCK-KENDRICK, 2013).

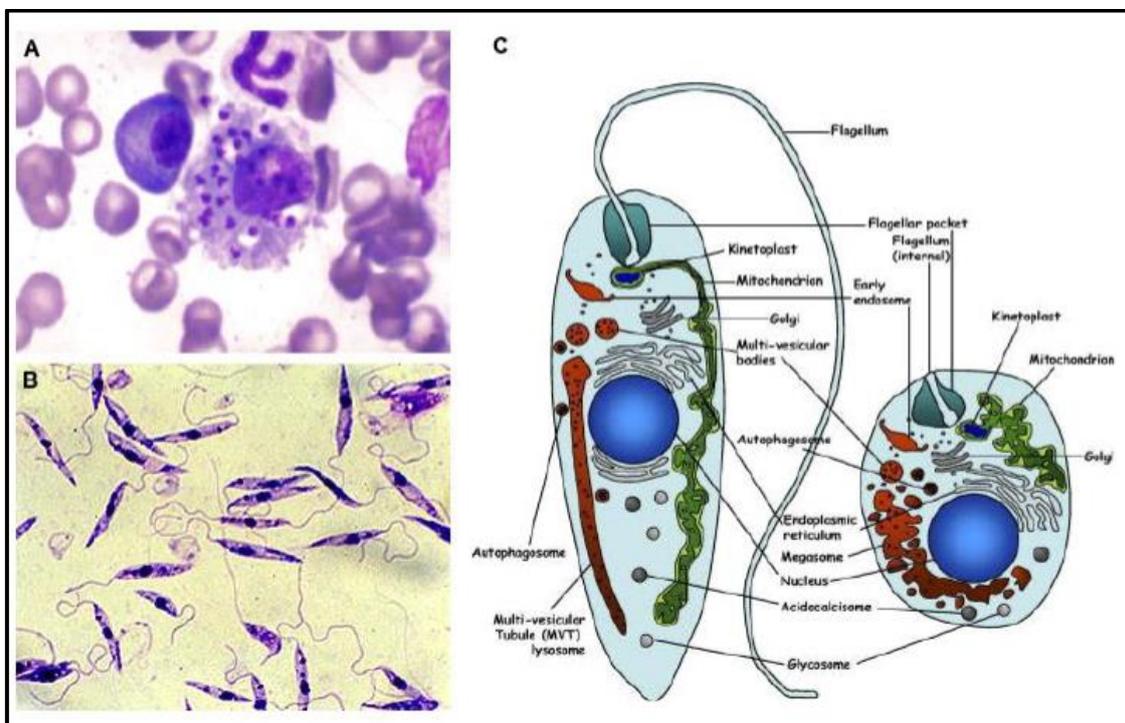
1.2. O gênero *Leishmania*

O gênero leishmania é composto por protozoários pertencente ao reino Protista, ao sub-reino Protozoa, ao filo Sarcomastigophora, ao sub-filo Mastigophora, a classe Zoomastigophorea, a ordem Kinetoplastida, a sub-ordem Trypanosomatina, e a família Trypanosomatidae (ROBERTS; JANOVY, 2000; BAIOTTO et al., 2009).

As espécies do gênero *Leishmania* são parasitos heteróxeos que necessitam de dois hospedeiros para completar seu ciclo celular; as fêmeas de dípteros dos gêneros *Phlebotomus* (no velho mundo) e *Lutzomyia* (no novo mundo), que atuam como os vetores de transmissão (MASLOV et al., 2013). E um vertebrado superior como os caninos, os mamíferos selvagens e o homem, que atuam como hospedeiros definitivos. Assim a forma residente no sistema digestório do hospedeiro invertebrado (mosquito), no sangue periférico do hospedeiro vertebrado e nos meios de cultivo é móvel, fusiforme e flagelada, sendo denominada de promastigotas (Figura 1-A); enquanto as formas observadas no hospedeiro vertebrado, é intracelular de células do sistema monócito-fagocitário (Macrófago), redonda e quiescente, e são denominadas de amastigotas (Figura 1-B).

Geneticamente os protozoários do gênero *Leishmania* apresentam o seu material genético de forma compactada em uma estrutura denominada cinetoplasto, que se apresenta como maxi e mini círculos de ácido desoxirribonucleico (DNA) extracelular e que são imprescindíveis para fisiologia de leishmania; além da presença de uma capa de glicoconjugado de lipofosfoglicano (LPG), fundamental para a sobrevivência do parasita (MONTE-NETO et al., 2011).

Figura 1 – Morfologia das espécies do gênero *Leishmania* sp. (A) formas amastigotas; (B) formas promastigotas; (C) Representação esquemática das formas promastigotas (esquerda) e amastigotas (direita), evidenciando as principais organelas intracelulares.



Fonte: (BESTEIRO et al.; *International Journal for Parasitology*, v. 37, 2007).

No início do século XXI os genomas de três espécies de *Leishmania* (*L. major*, *L. infantum* e *L. brasiliensis*) foram completamente sequenciados permitindo conhecer a existência de mais de 8.300 genes codificadores de proteínas e 900 genes de Ácido Ribonucleico (RNA) (TOLEDO et al., 2010). Com o sequenciamento, foi possível, determinar que *Leishmania* sp. apresenta uma organização genômica que permite diferenciar as espécies desse gênero

dos demais eucariotas. Segundo Kazemi (2011), os genes das espécies de *Leishmania* sp. não possuem *introns* (regiões não-codificantes do RNA mensageiro), os seus cromossomos apresentam um tamanho menor quando comparados aos de outros organismos, e possuem um maior número de genes altamente empacotado. Essas características permitem que seus genes se organizem em uma ou duas fitas de DNA. A partir do sequenciamento genômico e usando como referência o gene *hsp70* foi possível determinar que os genomas das espécies de leishmania ocorrentes no velho mundo (*L. donovani*, *L. infantum*, *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica*) se organizam em 36 cromossomos; enquanto os genomas das espécies de leishmania ocorrentes no novo mundo (*L. mexicana* e *L. braziliensis*) se organizam em 34 e 35 cromossomos, respectivamente (STERKRS et al., 2012). A partir desses dados foi possível propor uma nomenclatura baseada no gene que codifica a proteína de choque térmico 70, denominada *hps70* (Tabela 1).

Por alguns anos a classificação taxonômica das espécies de *Leishmania* foi baseada em fatores como a distribuição geográfica e as manifestações clínicas da doença, uma vez que os métodos clássicos de diagnósticos de cultivos dificultavam a diferenciação das espécies (PRATT; DAVID, 1981). Entretanto, em virtude da associação de técnicas moleculares à área de taxonomia, abriu-se um leque de opções a serem utilizadas na nomenclatura de leishmania, como exemplo pode-se citar a nomenclatura baseada na sequência do gene *hsp70*, proposta por Fraga e seus colaboradores (2010), que classificam *L. mexicana* e *L. braziliensis* como as únicas a serem nomeadas como espécies dentro do complexo *L. mexicana*, enquanto *L. amazonensis*, deve ser considerada uma subespécie. Ou então a classificação proposta por Mouri et al. (2014) cujos dados a identificação taxonômica através da análise por Espectrometria de Massas *Matrix Associated Laser Desorption-Ionization - Time of Flight* (MS/MALDI-TOF), que propõe uma classificação como a apresentada na Figura 2.

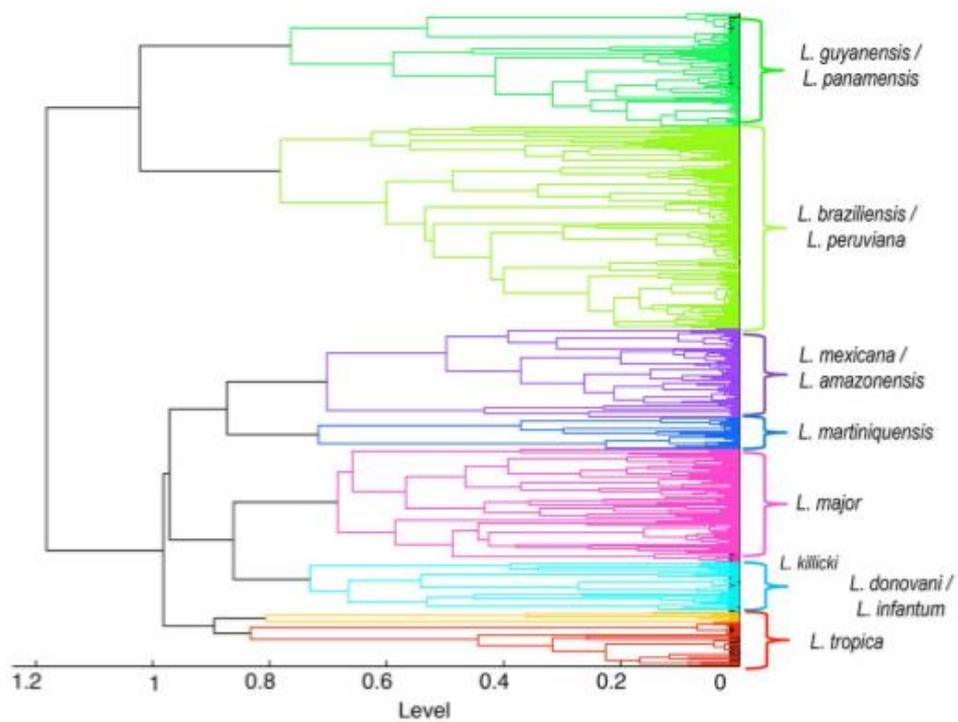
Tabela 1 – Nomenclatura para *Leishmania* sp. baseada na sequência do gene *hsp70*.

Gênero	Complexo	Espécie	Distribuição Geográfica	Espécies de acordo com <i>hsp70</i> .
<i>L. (Leishmania)</i>	<i>L. donovani</i>	<i>L. donovani</i>	China, Etiópia, Sudão, Quênia, Irã, Arábia Saudita, Iêmen.	<i>L. donovani</i>
		<i>L. infantum</i>	Albânia, Argélia, França, Espanha, Grécia, Itália, Marrocos, Portugal, Síria, Turquia, Iêmen.	
		<i>L. chagasi</i>	Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador, El Salvador, Guadalupe, Guatemala, Honduras, México, Nicarágua, Paraguai, Venezuela.	
		<i>L. archibaldi</i>	Índia, Sudão, Etiópia, Líbano, Israel.	
	<i>L. tropica</i>	<i>L. tropica</i>	Afganistão, Argélia, Azerbaijão, Grécia, Irã, Iraque, Israel, Marrocos, Túnez, Turquia, Yemen	<i>L. tropica</i>
		<i>L. aethiopica</i>	Etiópia, Quênia	
		<i>L. major</i>	Afganistão, Argélia, Irã, Iraque.	<i>L. major</i>
		<i>L. mexicana</i>	Colômbia, Costa Rica, República Dominicana, Equador, Guatemala, Honduras, México, Panamá, Venezuela.	<i>L. mexicana</i>
	<i>L. mexicana</i>	<i>L. amazonensis</i>	Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, Guayana francesa, Panamá, Peru, Venezuela.	
		<i>L. garnhami</i>	Venezuela	
		<i>L. guyanensis</i>		
		<i>L. panamensis</i>	Brasil, Colômbia, Equador, Guayana Francesa, Peru, Guayana holandesa, Venezuela.	<i>L. guyanensis</i>
		<i>L. naiffi</i>	Belice, Colômbia, Costa Rica, Equador, Honduras, Nicarágua, Panamá, Venezuela.	<i>L. naiffi</i>
<i>L. (viannia)</i>	<i>L. guyanensis</i>	<i>L. braziliensis</i>	Brasil, Guayana francesa, Equador, Peru.	<i>L. braziliensis</i>
		<i>L. peruviana</i>	Argentina, Bolívia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Equador, Guatemala, Honduras, Nicarágua.	
	<i>L. braziliensis</i>	<i>L. lainsoni</i>	Peru	<i>L. lainsoni</i>
			Brasil, Bolívia, Peru.	

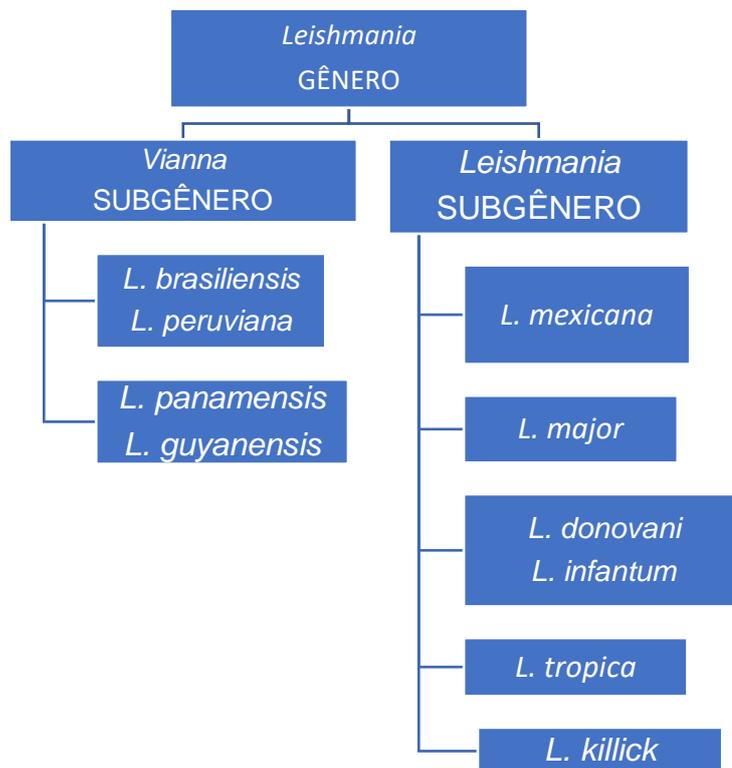
Fonte: (ANTINORI et al., *European Journal of Infections Diseases*, v.4, 2012).

Figura 2 – Agrupamento das espécies de *Leishmania* pela análise de espectros MS/MALDI-TOF. (A) Distância taxonômica das espécies; (B) Agrupamento de acordo com a presença e ausência de picos e algoritmos de interpretação.

A



B

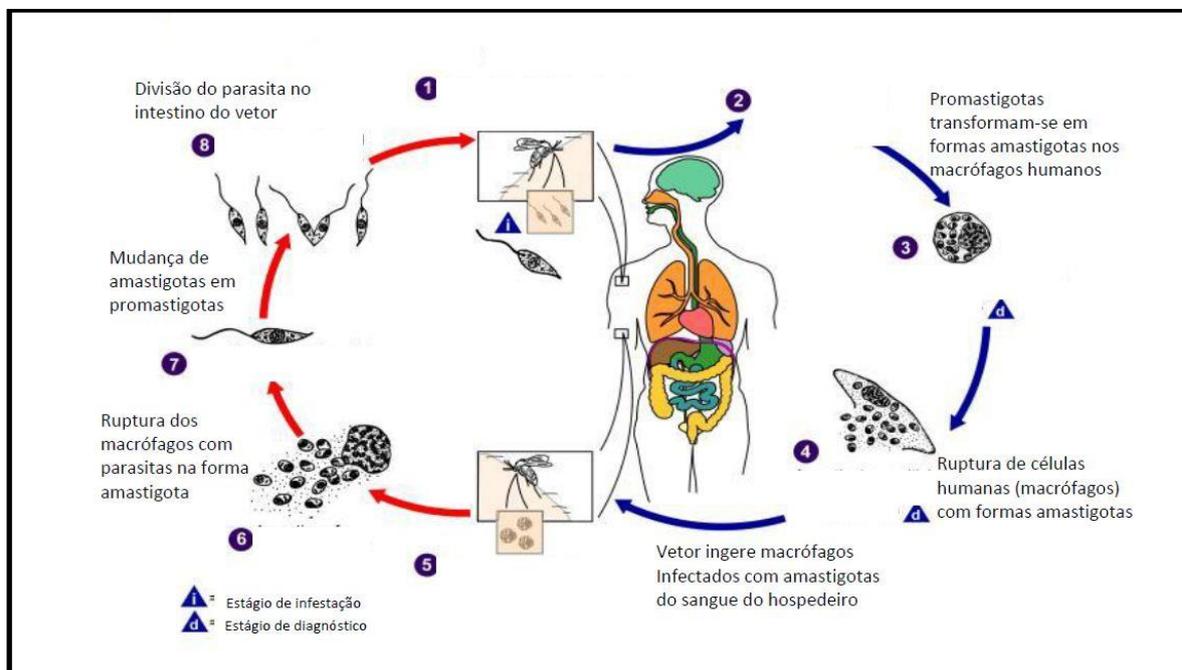


Fonte: (MOURI et al.; *Plos neglected Tropical Diseases*, v.8, 2014), adaptado

1.3. O Ciclo biológico de *Leishmania spp.*

O ciclo biológico de *Leishmania* é heteróximo e possui dois tipos de hospedeiros: os invertebrados, fêmeas de mosquitos dos gêneros *Phlebotomus* ou *Lutzomyia*, que atuam como vetores, onde no sistema digestório destes mosquitos são encontradas as formas promastigotas (forma móvel); e os vertebrados (roedores, edentados, canídeos, primatas e o homem), nos quais são encontradas as formas amastigotas (formas quiescentes) localizadas nos fagolisossomos dos macrófagos infectados (NAGLE et al., 2014) (Figura 3).

Figura 3 – Ciclo vital de *Leishmania sp.* Na cor vermelha são apresentados os acontecimentos desenvolvidos no interior do inseto vetor, enquanto na cor azul são apresentados os acontecimentos desenvolvidos no hospedeiro mamífero.

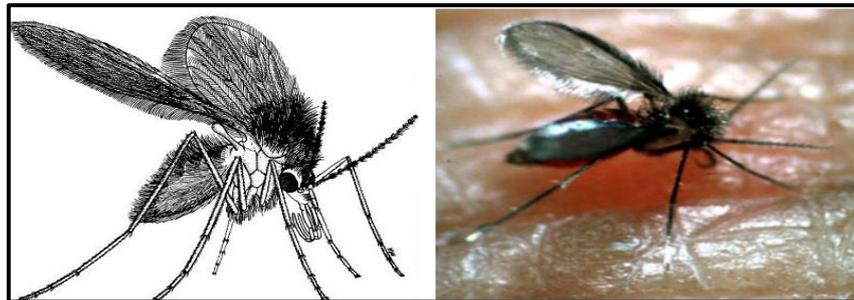


Fonte: (Nagle et al.; *Chemical Reviews*, v.114, 2014), adaptado.

No novo mundo o vetor mais comum das leishmanioses é o mosquito da espécie *Lutzomyia longipalpis* (Figura 4) conhecida popularmente como mosquito da terra, mosquito palha, birigui entre outros. O início do ciclo é caracterizado pela infecção do vetor que ocorre quando as fêmeas, ao sugarem o sangue de mamíferos infectados, ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas (BASANO; CAMARGO, 2004).

Segundo Dostalova e Volf (2012), a troca de hospedeiro faz com que o vetor enfrente uma mudança brusca de temperatura e pH, provocando a transformação da forma amastigota para a forma promastigota. Uma vez instalado no mosquito, a localização do parasita irá depender da espécie de leishmania. Deste modo, a espécie *L. braziliensis*, durante o seu desenvolvimento, passa pelo intestino posterior, antes de chegar a proboscide, enquanto a maioria das espécies de leishmania limitam seu desenvolvimento ao intestino médio.

Figura 4 – Fêmea da espécie *Lutzomyia longipalpis* mosquito transmissor das leishmanioses nos países do novo mundo.



Fonte: (YOUNG; *Computational Chemistry*, 1984; Killick-Kendrick; *Bulletin de la societe de Pathologie*, 1999).

A forma prosmatigota metaciclíca é a forma infectante do parasita, assim no momento em que a fêmea realiza o repasto sanguíneo, inocula a forma infectante na pele do hospedeiro vertebrado. A saliva infectada contendo proteínas e peptídeos bioativos reduzem o cálcio intracelular do hospedeiro provocando a vasodilatação, ao tempo em que a proteína maxaldina induz a secreção de citocinas anti-inflamatórias (IL-6, IL-1 β e IL-10), bloqueando a produção de linfócitos CD80, CD86 e CCR7 mediante a inibição das citocinas inflamatórias (IL-12 p-40, TNF- α e INF- γ) nas células derivadas de monócitos, promovendo assim a infecção do hospedeiro (SOARES et al., 1998; WHEAT et al., 2008).

Segundo Gillespie e Titus (2000), uma vez inoculada, as formas promastigotas metacíclicas estão protegidas por agente imunomoduladores presentes na saliva do inseto, e sua fagocitose é feita pelos neutrófilos que são produzidos por ativação do sistema complemento. Quando interiorizada na

célula hospedeira, no vacúolo parasitóforo, as formas promastigotas diferenciam-se em amastigotas, perdendo o flagelo e modificando a composição da membrana, começando a multiplicar-se intensamente até o rompimento dos mesmos, ocorrendo à liberação destas formas que serão fagocitadas por novos macrófagos num processo contínuo, ocorrendo então à disseminação hematogênica para outros tecidos ricos em células do sistema mononuclear fagocitário, como linfonodos, fígado, baço e medula óssea (TURCO; SACKS, 1991; FORESTER, 2013).

1.4. Manifestações clínicas das leishmanioses

As leishmanioses podem manifestar-se clinicamente sob cinco formas distintas, dependendo dos diferentes quadros clínicos: leishmaniose visceral, leishmaniose cutânea, leishmaniose cutânea difusa, leishmaniose mucocutânea e leishmaniose pós-calazar (ASHFORD, 2000); entretanto, em geral as leishmanioses são classificadas como: leishmaniose tegumentar (LT), que classicamente é dividida em leishmaniose cutânea, leishmaniose mucosa e leishmaniose mucocutânea; e leishmaniose visceral (LV) (MACCALL et al., 2013) (Tabela 2).

Atualmente as leishmanioses também são reconhecidas como uma doença oportunista associada à AIDS (*Acquired Immune Deficiency Syndrome*) por favorecer manifestações clínicas que variam de simples lesões cutâneas à doença visceral fatal (CROFT; OLLIARO, 2011).

Tabela 2 – Formas clínicas das leishmanioses e seus agentes etiológicos

Forma Clínica	Ocorrência	Agente etiológico
Leishmaniose cutânea	Comum	<i>L. major</i>
		<i>L. amazonensis</i>
	Rara	<i>L. mexicana</i>
		<i>L. braziliensis</i>
Leishmaniose mucocutânea	Comum	<i>L. infantum</i>
	Rara	<i>L. donovani</i>
		<i>L. braziliensis</i>
Leishmaniose visceral	Comum	<i>L. panamensis</i>
		<i>L. guyanensis</i>
		<i>L. amazonensis</i>
	Rara	<i>L. donovani</i>
		<i>L. infantum</i>
		<i>L. chagasi (= L. infatum)</i>
Rara	<i>L. tropica</i>	
	<i>L. amazonensis</i>	

Fonte: (MCCALL et al.; *PLoS Pathogens*, v.9, 2013).

A leishmaniose cutânea (Figura 5-A) é a forma benigna da doença e começa a se manifestar entre duas ou oito semanas depois da picada do mosquito, iniciando com uma pequena papila eritematosa com algum prurido e presença de ulceração (FERNANDEZ et al., 2008). Existem também uma forma

cutânea difusa, que se caracteriza pela presença de papilas e granulomas, que normalmente se desenvolvem nos membros inferiores (ALVAREZ, 2010).

A leishmaniose mucocutânea (Figura 5-B) é caracterizada pela erosão gradual da mucosa, uma grande destruição do tecido cartilaginoso (geralmente da boca e nariz) provocando graves deformações (ASHFORD, 2000).

A forma mais grave da doença é denominada de leishmaniose visceral (Figura 5-C) e ocorre principalmente no velho mundo e em grande parte da América do Sul. O parasito invade órgãos como baço, fígado, medula óssea, mucosa intestinal e glândulas suprarrenais, o que pode acarretar em falência múltipla dos órgãos. Essa é a forma da doença no qual é necessário o tratamento do paciente para evitar a sua morte (PRADA, 2013a; MUKHOPADHYAY et al., 2014).

Figura 5 – Manifestações clínicas das leishmanioses. (A) Leishmaniose cutânea. (B) Leishmaniose mucocutânea. (C) Leishmaniose Visceral



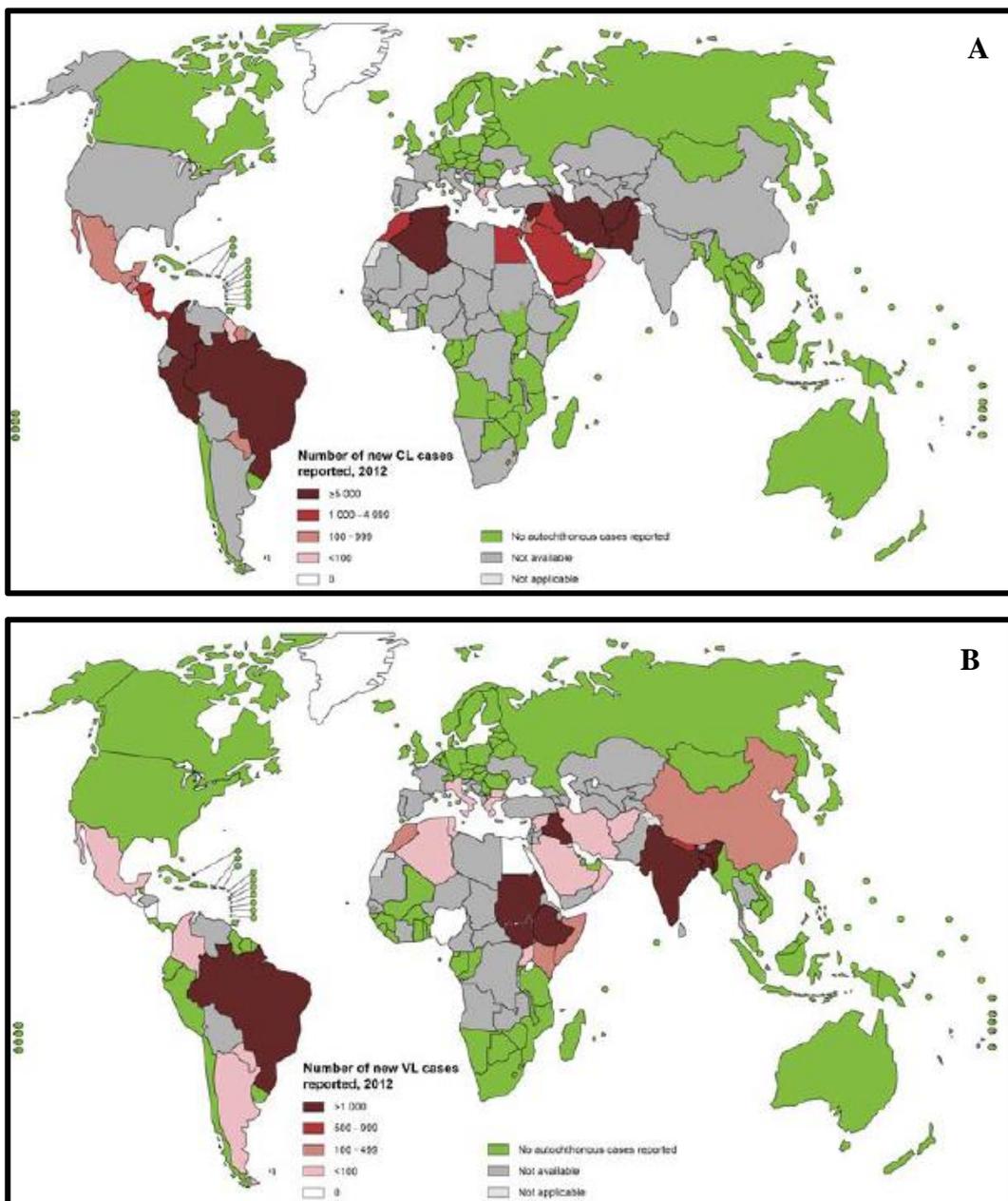
Fonte: (TEIXEIRA; *Atlas Didático: ciclos de vida da leishmania*, 2013).

1.5. Epidemiologia das leishmanioses e os principais fatores de risco

De acordo com as estimativas da OMS 1,3 milhões de novos casos de leishmaniose ocorrem a cada ano, dos quais em média 20.000 a 30.000 desses casos terminam com registro de óbito (WHO, 2015). Essa doença afeta principalmente as populações de países subdesenvolvidos e em desenvolvimento, com destaque para países da África, Ásia e América do sul. Aproximadamente a cada ano são registrados cerca 0,7-1,2 milhões de novos casos de LT, e cerca de 0,2-0,4 milhões de novos casos de LV (WHO, 2015).

Segundo dos dados da OMS (2012), os dez países com maior número de casos de LT são Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Peru, Sudão e Síria, representando valores entre 70 e 75% da incidência mundial estimada para doença (Figura 6-A). Enquanto, mais de 90% dos casos de LV encontram-se distribuídos em cinco países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia e Sudão (Figura 6-B).

Figura 6 – Distribuição epidemiológica mundial dos casos de leishmaniose a ano de 2012. (A) Leishmaniose tegumentar; (B) leishmaniose visceral.



Fonte: (<http://sinan.saude.gov.br>, acesso em 16/10/2016).

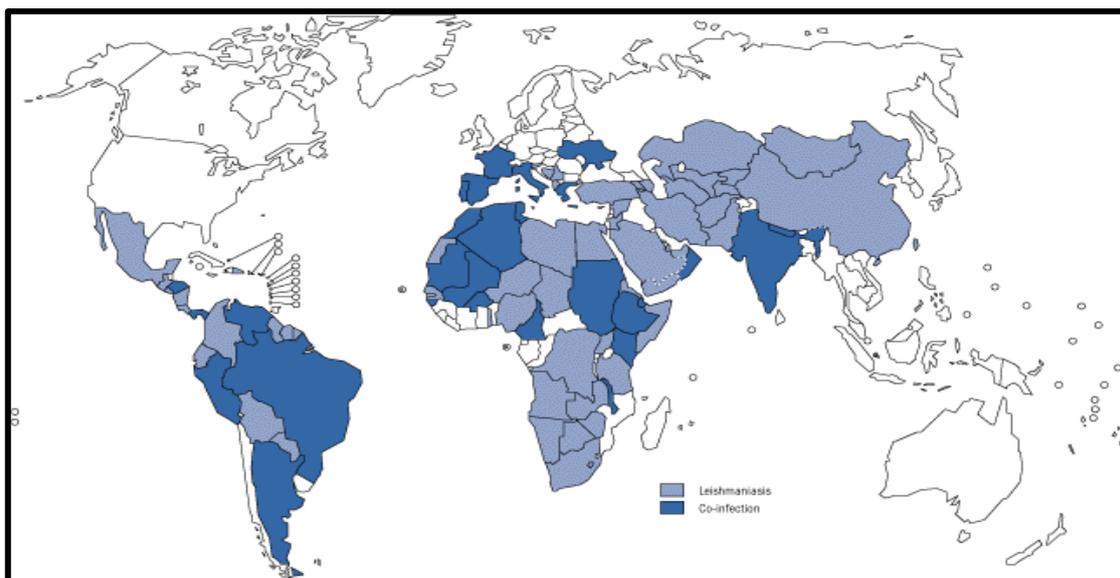
O Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) informa que até o ano de 2014, no Brasil, foram registrados 20.296 casos de LT, com o maior número de registro para região Norte (40,9%), seguida da região Nordeste (33,3%). Os dados do SINAN também apontam a região Nordeste como a líder no registro de casos de LV (51%) (SINAN, 2016).

É importante ressaltar que os dados oficiais acerca da epidemiologia da doença subestimam a realidade devido a vários fatores limitantes como: (i) a frequência descontínua de distribuição das zonas de transmissão em áreas endêmicas, (ii) o elevado número de casos que não são diagnosticados ou não são declarados; (iii) o elevado número de indivíduos assintomáticos infectados quando comparados com os de casos clínicos manifestados (RIERA et al., 2008). Ressalta-se também, que dos 88 países endêmicos, em apenas 33 deles as leishmanioses são doenças de declaração obrigatória (BERN et al., 2008).

De modo geral, a doença tradicionalmente é predominante nas áreas rurais e afeta, prioritariamente, pessoas de classe socioeconômica menos favorecida e desprovidas de cuidados à saúde (WHO, 2016).

Fatores como condições sanitárias precárias, falta de gestão de resíduos e falta de tratamento de esgotos são propícias à aproximação do vetor (WHO, 2010). Outros fatores, como desnutrição, fluxo migratório, mudanças ambientais e mudanças climáticas, também são classificados como fatores de risco da doença (SOLOMÓN et al., 2015). Outro fator de risco que merece destaque é a coinfeção com o vírus da imunodeficiência adquirida (HIV), uma vez que o portador do vírus apresenta maior risco de desenvolver leishmaniose, bem como de ter sua resposta ao tratamento antirretroviral prejudicada (WHO, 2010). Existem numerosos casos de coinfeção em regiões como Índia e África, onde em ambas as doenças tem uma grande prevalência, com incidência de coinfeção em torno de 9% (WHO, 2010) (Figura 7).

Figura 7: Mapa da distribuição geográfica da infecção por leishmaniose (cinza claro); e de coinfeção AIDS-leishmaniose (cinza escuro).



Fonte: (COELHO-JUNIOR et al.; *Journal of Tropical Parasitology*, v.300, 2016).

1.6. Controle de reservatórios e vetores

As espécies de mamíferos *Canis familiaris* (cão doméstico), *Dusicyon vetulus* e *Cerdocyon thous* (raposas) e *Dedelphis albiventris* (gambá) contribuem para permanência das leishmanioses nos meios doméstico e silvestre, sendo potenciais reservatórios da doença.

Os representantes da espécie *C. familiaris* é principal mantenedor do parasita no ambiente doméstico; em virtude do seu habitat peridoméstico, a longa duração da infecção nesta espécie, a alta prevalência de leishmaniose visceral canina próxima a focos humanos e a alta capacidade do animal em transmitir o agente etiológico ao vetor (DIAS et al., 2003; MISSAWA et al., 2008; PRADO et al, 2011).

O principal vetor da leishmaniose nas Américas é o díptero da espécie *Lutzomyia longipalpis*, a qual é encontrada desde o sul do México até o norte da Argentina (SILVA et al., 2007). Esta espécie é capaz de viajar por até 2,2 quilômetros e apresenta domiciliação completa e hábitos crepusculares e noturnos, sendo o período de maior atividade das 17 às 5 horas (FAUCHER; PIARROUX, 2011).

De acordo com o Ministério da Saúde do Brasil (2007), o controle das leishmanioses está baseado em medidas profiláticas de combate ao vetor, que inclui o uso de repelentes; evitar a exposição nos horários de atividades do vetor (crepúsculo e noite); uso de mosquiteiros de malha fina e telagem de portas e janelas; limpeza periódica dos abrigos de animais domésticos; e no extermínio de cães infectados, que são reservatórios de parasitas em áreas peridomiciliares.

1.7. Resposta Imune no hospedeiro vertebrado e mecanismos de invasão

Segundo Moraes et al. (2014) a interação leishmania-homem pode ser uma relação de equilíbrio (sem doença) ou desequilíbrio (leishmaniose), e o que vai determinar o tipo de interação são as características do parasita, como virulência e patogenicidade; e as características genéticas e imunológicas do hospedeiro vertebrado.

Embora as espécies de leishmania sejam, predominantemente, patógenos intracelulares obrigatórios de macrófagos, estudos demonstraram que estes protozoários infectam outras células hospedeiras, tais como neutrófilos, fibroblastos e células dendríticas (KAYE; SCOTT, 2011).

O início da infecção nos hospedeiros vertebrados acontece quando as formas promastigotas são inoculadas na pele através da picada dos insetos vetores infectados. Em seguida, o hospedeiro irá responder através de mecanismos da imunidade inata e adquirida (PATIL, 2012). Como estratégia de invasão, proteínas presentes na superfície celular da leishmania, são responsáveis pela interação com a célula do hospedeiro garantindo a sobrevivência, multiplicação e patogênese no hospedeiro vertebrado (GARG et al., 2005).

No momento da picada do inseto vetor, ocorre a liberação de alarminas, citocinas e quimiocinas que imediatamente recrutam neutrófilos, que passam a atuar contra os parasitas através de espécies reativas de oxigênio (ROS), neutrófilos elastase (NE), e redes extracelulares dos neutrófilos (NET) (KEYKE; SCOTT, 2011). Uma resposta imune é gerada a partir da secreção de citocinas anti-inflamatórias IL-6, IL-1 β , IL-10 e da ativação da cascata do sistema complemento, através da via clássica ou alternativa dependendo da espécie.

Para evitar a destruição, a forma promastigota se utiliza da proteína GP63, que é capaz de converter a proteína C3b em sua forma inativa, C3bi, a qual se unirá a superfície do parasito evitando assim o ataque por parte das proteínas do sistema complemento (SCOTT; NOVAIS, 2016).

De acordo com Peters et al. (2008), a internalização da forma promastigota no macrófago pode ser explicada por duas teorias. Na primeira, denominada “cavalo de Troia”, os neutrófilos fagocitam de forma massiva as promastigotas infectadas no lugar aonde ocorreu a picada do inseto vetor; e após o tempo médio de vida desses neutrófilos, cerca de 6 a 10 horas, essas células entram espontaneamente em apoptose e os macrófagos então fagocitam os restos celulares que contém o parasito no seu interior (LASKAY et al., 2008). A outra teoria, denominada “coelho de Troia”, postula que o parasito não entra no interior do neutrófilo, e sim fica próximo a um neutrófilo em apoptose e aproveita o momento em que será fagocitado pelo macrófago e assim entrar na célula (RITTER et al., 2009).

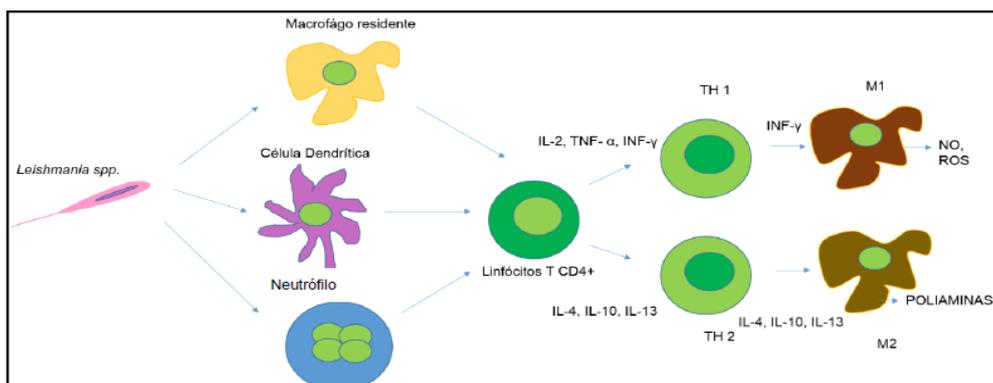
De modo geral, a fagocitose de micro-organismos por macrófagos é iniciada pela interação de receptores presentes na superfície do fagócito com ligantes na superfície do micro-organismo (ZAK; ADEREM, 2009). No caso da fagocitose de formas promastigotas de leishmania, o parasita vai se ligar aos receptores componentes do sistema complemento, CR1 e CR3, localizados na superfície dos macrófagos (SAHA et al., 2004). Além disso, na superfície celular do parasita estão presentes proteínas ancoradoras, denominadas glicosilfosfatidilinositol (GPI), que formam uma cobertura protetora e mediam a interação parasita-hospedeiro (ALEXANDER; BRYSON, 2005). Uma das glicoproteínas ancoradas por GPI presente na superfície da leishmania é a GP63, cuja função é clivar a molecular C3b em C3bi, impedindo assim a ação do sistema complemento sobre o parasita (KAYE; SCOTT. 2011). Outra proteína presente na superfície do parasita é a lipofosfoglicano (LPG), esta proteína tem um importante papel na interação leishmania-complemento e, ainda, se liga e interage com outras proteínas para promover a entrada do parasita na célula (SAHA et al., 2004).

Quando as formas promastigotas são internalizadas, a resistência do hospedeiro pode ser determinada por uma resposta do tipo Th-1, composta principalmente por componentes celulares, cujas evidências apontam que com

esse tipo de resposta há uma proteção durante a infecção (GABRIEL et al., 2010; SCOTT; NOVAIS, 2016); enquanto a susceptibilidade do hospedeiro pode ser mediada por uma resposta do tipo Th-2, caracterizada por exacerbar a doença (KEMP, 2000).

Uma vez incorporada pelos macrófagos as formas promastigotas de leishmania sofrem uma reorganização estrutural, no qual perde o flagelo e troca a composição da membrana, transformando-se na forma amastigota. O destino das formas amastigotas no interior do macrófago vai depender do seu estado de ativação. Os linfócitos ativados pela rota clássica (M1), participam da resposta protetora produzindo predominantemente citocinas inflamatórias Th-1, que são produtoras de interferon gama (IFN- γ), essa citocina interage com os macrófagos e desencadeia a liberação do Fator de Necrose Tumoral alfa (TNF- α) (TUON et al., 2008). A ação conjunta de IFN- γ e TNF- α ativa o gene que produz a enzima óxido nítrico sintetase induzida (iNOS) e que resulta na produção de NO a partir de *L*-arginina (BALAÑA-FOUCE et al., 2012b). Os mediadores mais bem descritos e envolvidos na morte do parasita por macrófagos ativados com IFN- γ e TNF- α são: superóxido (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), óxido nítrico (NO) e o peroxinitrito, que são formados durante o *burst* respiratório (LINARES et al., 2001). Os macrófagos ativados por Th-2 promovem uma rota alternativa (M2), mediada por citocinas que incluem TFG- β , IL-4, IL-10 e IL-13, fazendo com que a célula imune permita o desenvolvimento do parasito, devido a ativação da síntese de poliaminas a partir da *L*-arginina; essas citocinas têm sido associadas com a desativação dos macrófagos e inibição da produção de NO, exacerbando, assim, a infecção pelo parasita (MURRAY et al., 2006) (FIGURA 8).

Figura 8 – Resposta imune do hospedeiro vertebrado a *Leishmania* sp.



Fonte: (SANTOS; Dissertação de Mestrado, UFAL, 2014).

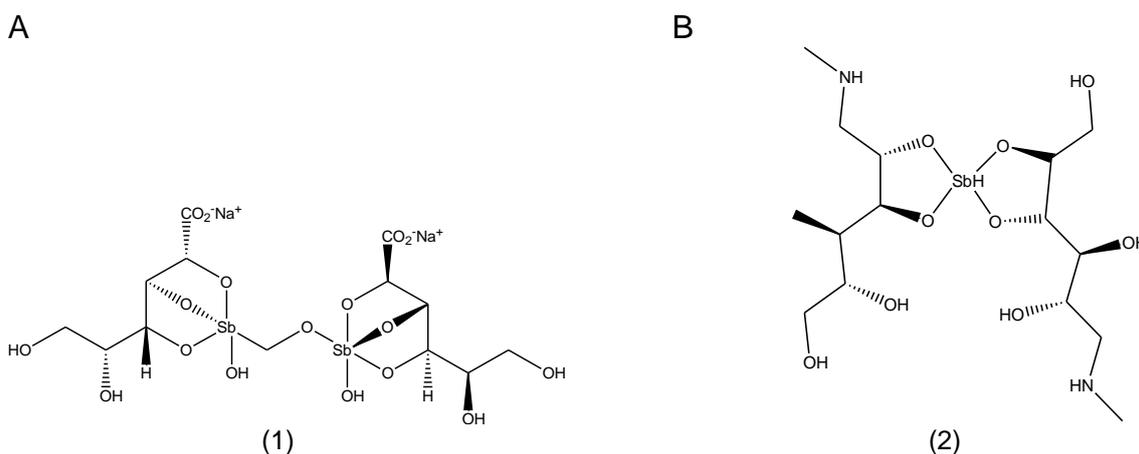
Segundo Balaña-Fouce et al. (2012b), o metabolismo de *L*-arginina é fundamentalmente importante tanto no parasito como no hospedeiro, uma vez que realizam um importante papel de ativação do macrófago assim como na sobrevivência do parasito durante a infecção. Caso este substrato venha a ser utilizado pela enzima iNOS, que está nas células M1, irá promover a síntese de óxido nítrico, importante para a eliminação do parasito. Mas caso esse aminoácido seja utilizado pela arginase, que está em células M2 irá fazer com que ocorra a síntese de poliaminas, que são utilizadas como fonte de energia do parasito, aumentando assim sua infectividade e conseqüentemente proliferação da infecção.

3. Quimioterapia e alvos moleculares

Os atuais tratamentos que se utilizam frente as leishmanioses são limitados, caros e tóxicos, além do fato da maioria requerer hospitalização. Ademais, nos últimos anos tem sido observado um aumento significativo de resistência aos mesmos (MENEZES et al., 2015).

Desde 1945 os fármacos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses têm sido os antimoniais pentavalentes (Sb^V), entretanto, a eficácia destes fármacos tem decrescido, tanto por sua toxicidade, quanto pelo aparecimento e disseminação de cepas resistentes (AMATO et al., 2008). Atualmente os Sb^V disponíveis no mercado são o Estibogluconato de sódio (1) (Pentostan[®], Glaxo Wellcome e Solustibosan[®], Bayer) e o Antimoniato de N-metilglucamina (2) (Glucantime[®], Rhône-Poulenc-Rohrer) (GIL et al., 2008) (FIGURA 9).

Figura 9 – Estruturas químicas de antimoniais pentavalentes. (A) Estibogluconato de sódio; (B) Antimoniato de *N*-metilglucamina



Para que esses fármacos sejam ativos faz-se necessário a redução do estado de oxidação, sendo a forma reduzida a responsável pela toxicidade do fármaco e de seus efeitos secundários. Esse processo reducional ocorre tanto no macrófago, quanto nas formas amastigotas (ZHOU et al., 2004). Acredita-se que o principal efeito do fármaco é um decréscimo nos níveis de ATP do parasito, devido a alteração da glicose e da oxidação dos ácidos graxos (BALAÑA-FOUCE et al., 1998); entretanto, outras hipóteses também são consideradas, por exemplo, a proposta por Chai et al. (2005), que menciona que o sal da SbIII inibi as enzimas tripanotiona redutase e glutaciona sintetase (enzimas do parasita), comprometendo a sua principal atividade que é a proteção dos parasitos contra danos oxidativos e da ação de metais pesados. Outra hipótese sustenta a eficácia do fármaco pelo fato dele envolver a inibição da adenosina e da guanosina trifosfato, por inibição da glicólise e do ciclo do ácido cítrico nos parasitas (MEDEIROS; ROSELINO, 1999).

A administração de Sb^v é por via intramuscular durante 28 dias, e em caso de LT por aplicação direta na lesão. Os principais inconvenientes dos tratamentos com Sb^v são seus efeitos secundários, como dor na região de aplicação, mialgias, anorexia, náuseas e vômitos (NAVIN et al., 1992).

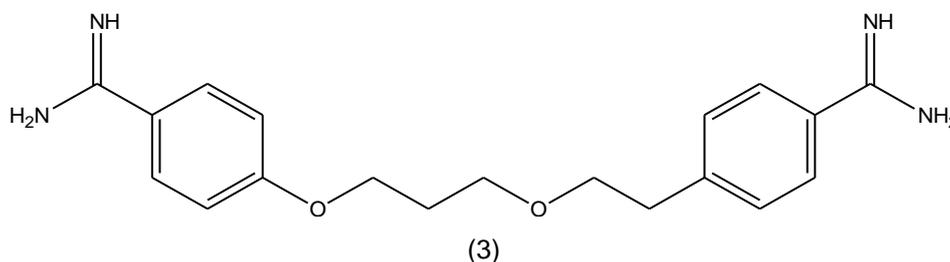
No Brasil, utiliza-se como medicamento de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose, o antimonial pentavalente Glucantime®, que é distribuído aos hospitais pelo Ministério da Saúde. Com o objetivo de padronizar

o esquema terapêutico, a OMS recomenda que a dose desse antimonial seja calculada em mg Sb^v/Kg/dia, num período de 20 a 30 dias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Outros fármacos recomendados para o tratamento das leishmanioses são a Pentamidina (3), a Anfotericina B (4), a Miltefosina (5) e a Paramomicina (5) (MENEZES et al., 2015).

A pentamidina (3) (FIGURA 10) é uma poliamidina aromática de efeito pleiotrópico e atua em distintos níveis, inibindo a síntese e o transporte de poliaminas do parasito; se unindo de maneira irreversível ao sulco do DNA cinetoplastídeo, impedindo sua replicação; inibindo a DNA topoisomerase II do parasito e produzindo um colapso do potencial de membrana mitocondrial (BALAÑA-FOUCE et al., 2008; NGUEWA et al., 2005). A administração desse medicamento é intramuscular ou intravenosas e seu uso é limitado devido a sua alta toxicidade, que é capaz de produzir efeitos secundários como *Diabetes mellitus*, hipoglicemia, isquemia cardiovascular e toxicidade renal (PAULA et al., 2003). A dose recomendada é de 4 mg/Kg/dia, por via intramuscular profunda, a cada dois dias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

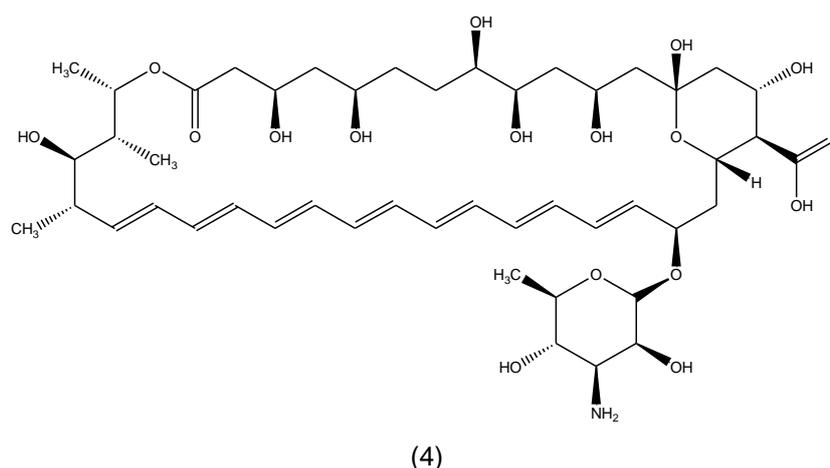
Figura 10 – Estrutura química da pentamidina.



A anfotericina B (4) (Figura 11) é um antibiótico poliênico macrocíclico produzido pela espécie *Streptomyces nodosus*, e apesar de sua alta toxicidade, tem sido um dos medicamentos de primeira linha para o tratamento da leishmaniose sendo recomendada para o tratamento de casos graves não responsivos ao tratamento com antimoniais (CROFTT; OLLIARO, 2011). A nefrotoxicidade é o efeito colateral mais comum observado com o uso da anfotericina B. Com o objetivo de diminuir essa alta nefrotoxicidade, formulações

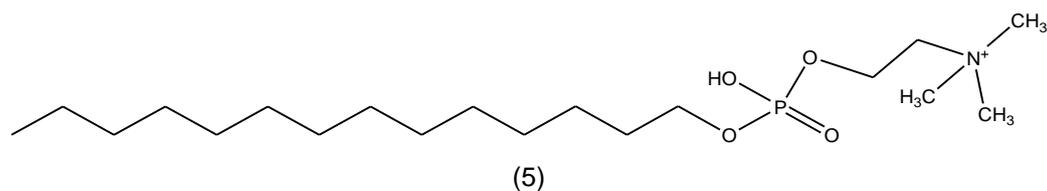
de anfotericina B (complexo lipídico, formulação coloidal e lipossomal) foram desenvolvidas para reduzir os efeitos adversos e melhorar a farmacocinética e biodisponibilidade do medicamento (CROFFT; OLARRO, 2011; MENEZES et al., 2015). A OMS recomenda a administração via endovenosa em doses diárias de 50 mg em cada aplicação, considerando 1 mg/Kg/dia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Figura 11 – Estrutura química da anfotericina B



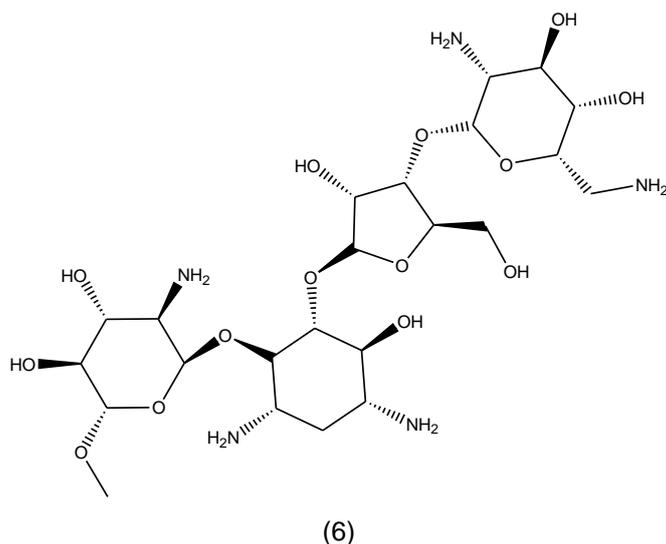
A mitelfosina (5) (Figura 12) é um derivado da fosfocolina, denominado alquilfosfolipídico e inicialmente foi desenhado como um fármaco de caráter antitumoral, entretanto em 1987 sua eficácia como leishmanicida ficou comprovada (CROFT et al., 1987). De acordo com Verma et al. (2007), esse fármaco tem um efeito imuno-estimulante, que produz a ativação dos linfócitos T de ação microbiana dos macrófagos, induzindo, assim, a apoptose dos parasitos. Porém seu mecanismo de ação não foi totalmente elucidado, alguns trabalhos relatam ocorrer inibição da síntese de éster-lipídios e inversão a relação fosfotidilcolina-fosfatidiletanolamina da membrana plasmática do parasita (RAKOTOMANGA et al., 2007; RAKATOMANGA et al., 2011). O tratamento da leishmaniose com a utilização desse fármaco é feito por monoterapia, durante 28 dias, com doses diárias de 2,5 mg/kg/dia (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Figura 12 – Estrutura química da mitelfosina.



O fármaco paromicina (Figura 13) é um antibiótico aminoglicosídeo, produzido por *Streptomyces krestomuctitus* que atua impedindo a síntese de proteínas ao inibir diferentes proteínas ribossomais do parasito. O evento adverso mais comum com paromomicina é dor no local da injeção (55%); no entanto, a ototoxicidade reversível (2%) e um aumento nas transaminases hepáticas (6%), são outros efeitos atribuídos ao uso desse fármaco (NAGLE et al., 2014; MENEZES et al., 2015). A dose recomendada é de 11 mg/kg/dia por 21 dias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Figura 13 – Estrutura química da paromicina.



Uma vez que as monoterapias têm efeitos curativos e limitados, onde geralmente ocorrem recaídas e aparecimento de resistências por parte do parasita, alguns estudos tem provado que o uso de terapias combinadas pode gerar resultados mais promissores. A pesquisa de Van Griensven et al. (2010), registrou eficácia em torno de 90% no tratamento de LV em um ensaio clínico de fase III, usando a combinação de anfotericina B (4) e mitelfosina (5) em doses repetidas durante 14 dias.

Além da elevada toxicidade, os fármacos leishmanicidas disponíveis apresentam outro inconveniente, a constante indeterminação de seus alvos quimioterápicos. Nos últimos anos, as pesquisas vêm priorizando a identificação de alvos enzimáticos vitais para o parasita (MELOS; ECHEVARRIA, 2012), com ênfase em diferenças estruturais e funcionais significativas dos seus homólogos de mamíferos, garantindo a inibição seletiva desses alvos (CHAWLA; MADHUBALA, 2010; SINGH et al., 2012).

Segundo Melos e Echevarria (2012), as principais vias metabólicas e enzimas estudadas como alvos para o desenvolvimento de novos fármacos com atividade antiparasitária frente aos tripanossomatídeos são: (a) enzimas da via glicolítica; (b) enzimas da biossíntese de poliaminas; (c) enzimas da biossíntese de esteróis; (d) enzimas do metabolismo do folato; (e) enzimas da biossíntese de microtúbulos; (f) tripanotiona redutase; (g) óxido nítrico sintase; (h) arginase; (i) cisteína protease; e (j) superóxido dismutase. Além das vias metabólicas e enzimas supracitadas, destaca-se também as enzimas DNA topoisomerases, que por serem protagonistas do escopo deste trabalho, as mesmas serão apresentadas em detalhes no item 6 deste capítulo.

O metabolismo energético dos tripanossomatídeos depende unicamente dos recursos de carbono disponível na célula hospedeira. Sete enzimas glicolíticas (hexoquinase, glucose-6-fosfato isomerase, fosfofrutoquinase, aldolase, triosefosfatase isomerase, glicerolaldeido-3-fosfatase desidrogenase e fosfogliceratoquinase) são compartimentadas no glicossomo, em uma estrutura denominada peroxissomos. A compartimentalização única de enzimas glicolíticas em glicossomos de leishmania, e sua grande distância filogenética com os hospedeiros mamíferos, fornece características únicas que podem ser exploradas através do desenvolvimento de inibidores específicos sobre a base da estrutura das enzimas parasitárias (CHUDZIK et al., 2000; CHAUDHURY et al., 2003; CHAWLA; MADHUBALA, 2010).

As poliaminas são moléculas que apresentam em sua estrutura grupamentos amino separados por cadeias metilênicas hidrofóbicas, que atuam regulando o crescimento e a diferenciação celular. Estas enzimas funcionam como substrato para tripanotiona redutase durante a síntese de tripanotiona. Os tripanossomatídeos utilizam a via tripanotiona/tripantionina redutase para realizar

o balanço redox; não obstante, nos mamíferos esse balanço redox é realizado via glutational/glutational redutase (MICHELETTI; BEATRIZ, 2012).

Os esteroides são componentes importantes da membrana celular e são vitais para o funcionamento e manutenção da estrutura da célula. Ao contrário das células de mamíferos, que têm colesterol como o principal esteroide de membrana, os tripanossomatídeos sintetizam ergosterol e outros 24 tipos de metil esteróis que são necessários para o seu crescimento e viabilidade. Estes esteróis estão ausentes nas células de mamífero (CHAWLA; MADHUBALA, 2010). Assim, etapas da biossíntese de esteroides do parasita e que são divergentes em relação à síntese realizada por células de mamíferos, são intensamente estudadas como alvo quimioterápico (SINGH et al., 2012).

A enzima di-hidrofolato redutase (DHFR), da via dos folatos é responsável pela redução do ácido dihidrofólico a ácido tetra-hidrofólico, utilizando como cofator o fosfato de dinucleotídeo de adenina e nicotinamida (NADPH). Uma vez inibida, a formação de tetra-hidrofolato prejudica diretamente o metabolismo dos ácidos nucléicos e aminoácidos, já que esse composto é essencial para a síntese de bases nitrogenadas. Com a descoberta da existência de um único polipeptídeo com o domínio DHFR em amino terminal, os inibidores de DHFR foram registrados como eficazes contra leishmania (NEAL; CROFT, 1984; HARDY et al., 1997).

Estruturalmente as espécies de leishmania apresentam uma consistência graças a presença de uma rede de filamentos proteicos que é denominada de citoesqueleto (HAWKINS et al., 2010). Este citoesqueleto é composto por microtúbulos, e por filamentos de actina e miosina; estes microtúbulos são sintetizados por uma enzima chamada de tubulina. Devido ao fato dessa enzima intervir em funções fundamentais da célula como o movimento celular formado pelo flagelo, o transporte de vesícula e a manutenção da forma celular, a biossíntese de microtúbulos é um processo metabólico que se apresenta como alvo quimioterápico para o tratamento de leishmaniose (LIBUSOVÁ et al., 2004; HAWKINS et al., 2010). A diferença estrutural em torno de 18% entre tubulinas do parasita e do hospedeiro é outro indicativo do potencial alvo quimioterápico das enzimas da biossíntese de microtúbulos (MELOS; ECHEVARRIA, 2012).

Tripanotiona redutase é uma enzima que pertence à família dos dissulfeto oxiredutase (FAD), que permite a manutenção da tripanotiona em sua forma

reduzida (WERBOVETZ, 2000). A tripanotona é uma molécula chave contra o estresse oxidativo em leishmania, constituindo-se como o principal mecanismo de defesa e assim assegurando a sobrevivência do parasita (MELOS; ECHEVARRIA, 2012).

A enzima óxido nítrico sintase (NOS) é uma enzima cuja participação na resposta imunológica em mamíferos é bem conhecida. Assim como a arginase, essa enzima utiliza *L*-arginina como substrato produzindo citrulina e óxido nítrico (MELOS; ECHEVARRIA, 2012); além disso, a *L*-arginina atenua o mecanismo de morte parasitaria dependente de NOS dos macrófagos (REGUERA et al., 2009). A via NOS é um potencial alvo quimioterápico, uma vez que os inibidores de arginase diminui a capacidade da leishmania em estabelecer a infecção em macrófagos (CARNEIRO et al., 2015; PANDAYA et al., 2016).

A arginase é uma metaloenzima que catalisa a hidrólise de *L*-arginina para *L*-ornitina e ureia, permitindo aos mamíferos eliminar ureia (MELOS; ECHEVARRIA, 2012). De acordo com Carneiro et al. (2015), essa enzima atua negativamente na regulação dos níveis de NO produzido pela NOS, diminuindo a produção de óxido nítrico pelo macrófago, impedindo uma melhor resposta imunológica natural.

A enzima cisteína protease é um importante fator de virulência para a invasão do parasito no hospedeiro e na patogenia das leishmanioses (GUEDES et al., 2010). Essas enzimas são vitais no ciclo de vida do parasito desempenhando funções como manutenção da viabilidade e da morfologia do parasito, fatores de virulência, invasão do sistema fagocitário mononuclear do hospedeiro e modulação da resposta imune (MOTTRAN et al, 2004; SILVA-LÓPEZ, 2010). Por esses aspectos funcionais a cisteína protease é um atrativo alvo quimioterápico uma vez que essa molécula é importante para a sobrevivência das formas promastigotas e amastigotas (SAFFARI; MOHABATKAR, 2009).

A enzima superóxido dismutase, catalisa a transformação do radical superóxido em oxigênio molecular e peróxido de hidrogênio, através de reações alternadas de redução e oxidação do sítio ativo da metaloenzima (MELO; ECHEVARRIA, 2012). Quando os macrófagos são ativados, um mecanismo parasitário que envolve a ação da superóxido dismutase, permite a desintoxicação e neutralização de danos causados pelo estresse oxidativo e por

espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidos pelos macrófagos durante a infecção (LONGONI et al., 2013). Em geral, a enzima superóxido dismutase de tripanossomatídeos possui um metal presente em seu sítio ativo, ausente em células de mamíferos, o que explica o interesse sobre esta enzima como alvo quimioterápico (PLEWES et al., 2003).

4. Vacina e imunoterapia

De acordo com Masih et al. (2011) é possível alcançar o controle da doença por meio de vacinação, uma vez que o sistema imunológico responde fortemente, quando de uma segunda exposição ao agente de leishmania. Nesse sentido, vários trabalhos, em modelos experimentais, tentam caracterizar a resposta imune do hospedeiro, através de testes que incluem diversas alternativas de antígenos e adjuvantes, assim diferentes estratégias de vacinação contra leishmania em ensaios *in vivo* vem sendo testadas, entretanto, a complexidade do ciclo biológico de seu agente causador e sua capacidade de evadir a resposta imune, tem dificultado a geração de uma vacina para leishmaniose (COLER; REED, 2005).

Dentre as vacinas de 1^o geração, aquelas que consistem em inocular o parasito vivo ou morto, pode-se citar os estudos de Daneshvar et al. (2009) e Daneshvar et al. (2010), que utilizaram cepas de *L. infantum* atenuada com antibióticos, no qual a combinação com gentamicina promoveu uma reversão na virulência, que foi evidenciada pela não ocorrência de lesões histopatológicas no baço e no fígado de cães após transcorridos dez meses da administração.

Considerando as vacinas de 2^o geração, aquelas que fazem uso de parasitos modificados geneticamente ou antígenos purificados, o estudo de Calvo-Álvarez et al. (2012), que usando uma cepa de *L. infantum* deficiente da proteína de choque térmico 70-II, mostrou através de um ensaio de vacinação experimental, em um modelo usando BALB/c, apresentando lesão cutânea com leishmania mutante MCherry + *L. major* (Dhsp 70-II), descreveu resultados efetivos na ativação do sistema imunológico e na manutenção da proteção.

As vacinas de 3^a geração, aquelas que consistem na inoculação de um plasmídeo de expressão eucariótica com o gene clonado de um determinado antígeno, quando testadas em camundongos, utilizando células dendríticas

derivadas de medula óssea, nas quais foram inseridos peptídeos de leishmania (KMP-11) e nucleotídeos apresentaram proteção significativa (AGALLOU et al., 2011).

De acordo com Lima et al. (2010), o método representativo mais eficiente para reduzir a incidência de leishmaniose em humanos, seria o desenvolvimento de uma vacina para cães. Seguindo essa premissa, no Brasil, a vacina leishmune®, foi liberada comercialmente, para profilaxia em cães, e o registro da proteção é próximo a 95% (BORJA-CABRERA et al., 2010).

Em humanos, a vacina recombinante Leish-111f, composta por três proteínas do parasito, um antioxidante específico de tiol (TSA), a proteína induzível por estresse de *L. major* (LmSTI1) e por um fator de iniciação da alongação de *L. brasiliensis*, é a primeira vacina que progrediu nos estudos clínicos e atualmente encontra-se na fase II (CHAKRAVARTY et al., 2011).

A utilização da imunoterapia bem como da imunoquimioterapia tem alavancado as pesquisas que objetivam a busca por protocolos terapêuticos mais efetivos, principalmente nas formas mais graves da doença (BALAÑA-FOUCE et al., 2012a).

Além de vacinas com aplicabilidade no campo da imunoterapia, outros imunobiológicos, como citocinas pró-inflamatórias com o IFN- γ , fator estimulador de colônia granulócito-macrófago e anticorpos monoclonais, têm sido empregados no tratamento das leishmanioses (GAUTAN et al., 2011).

Pesquisas que associam vacinas terapêuticas/imunomoduladores e fármacos concomitantemente, também têm investigadas (MIRET et al., 2008). Entretanto, até o presente momento ainda não houve o desenvolvimento de uma vacina.

5. Atividade leishmanicida de substâncias naturais e compostos semissintéticos.

Ao longo da história da civilização, o uso de plantas com finalidade terapêutica está intimamente relacionado à própria evolução do homem. Substâncias orgânicas originadas de fontes naturais há muito tempo são utilizadas no tratamento de inúmeras enfermidades no ser humano (WHO, 2003; BRANDÃO, 2010).

Além das plantas, um outro produto natural utilizado com finalidade terapêutica, é a própolis. Própolis é uma resina coletada por abelhas, que em geral, contém resinas e bálsamos (50%), ceras (30%), óleos essenciais e aromáticos (10%), pólen (5%) e outros materiais orgânicos (5%). Em virtude de suas propriedades farmacológicas, que incluem efeitos antioxidantes, antitumoral, antibacteriano, antiviral e antifúngico, esse produto é alvo de pesquisas na área de desenvolvimento de fármacos a partir de produtos naturais (TRAN et al., 2013; PETELINC et al., 2013; SILVA et al., 2014).

De acordo com Newman e Cragg (2012), em uma análise dos medicamentos disponibilizados no mercado entre 1981 e 2010, 74,8% destes possuem princípios ativos isolados de produtos naturais, ao passo, que 48,6% são sintéticos com grupos farmacofóricos baseados em estruturas de produtos naturais, o que faz com a área de produtos naturais seja explorada continuamente.

O desenvolvimento de metodologias para isolamento e identificação de compostos oriundos de fontes naturais propiciou um aumento no número de novas estruturas químicas bioativas para indicações terapêuticas. Concomitantemente, desenvolveram-se métodos de *Screening* biológico automatizados (*High Throughput Screening* – HTS) que permitem testar *in vitro* um maior número de substâncias frente a alvos biológicos específicos em curto espaço de tempo (BRANDÃO et al., 2010).

Os dados levantados por Newman e colaboradores (2003) apontam que medicamentos derivados de produtos naturais são capazes de tratar 87% das enfermidades humanas categorizadas, incluindo as classificadas com antimicrobianas, anticancerígenas, anticoagulantes, imunossupressora e antiparasitária.

No que concerne às atividades antiparasitárias atribuídas aos produtos naturais, à busca por agentes leishmanicidas vem sendo realizada, desde década de 80, com interesse no estudo de medicamentos tradicionais como protótipos para o desenvolvimento de novos compostos quimioterápicos com melhor atividade e menos efeitos colaterais (ARAÚJO et al., 1998; GIL et al., 2008). Nesse contexto, parcerias e consórcios científicos tem sido formalizados para apoiar o desenvolvimento de novos agentes leishmanicidas a partir de drogas semissintéticas e naturais (PATIL et al., 2012).

Das substâncias naturais com registros de atividade leishmanicida há um predomínio de alcaloides, flavonoides, triterpenos e quinonas (GIL et al, 2008; SEN; CHATTERJEE, 2011).

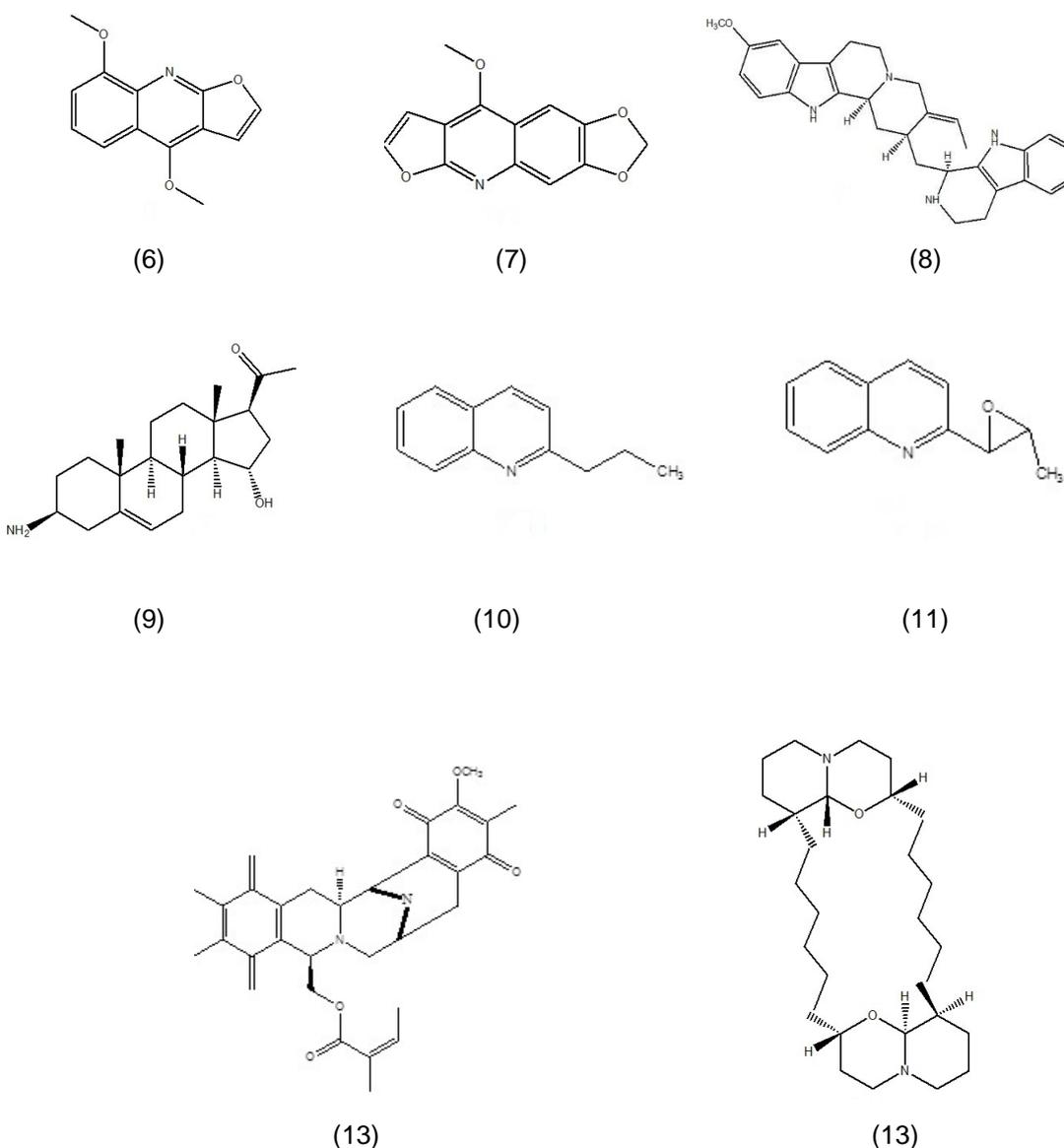
Os alcaloides é um dos principais grupos de metabolitos secundários encontrados em organismos vivos e que apresentam diferentes arranjos estruturais, vias biossintéticas diversas e diferentes atividades farmacológicas. Embora os alcaloides tenham sido tradicionalmente isolados de plantas, um número crescente está presente em animais, insetos, invertebrados marinhos e micro-organismos (ROBERT; WINK, 1998). Muitos alcaloides têm sido usados na medicina e, alguns são drogas proeminentes no estudo por fármacos leishmanicidas efetivos (Figura 14).

Os alcaloides furoquinolinas, γ -farigina (6) e masculina (7), isolados de casca do caule de *Helietta apiculata*, exibiram significativa atividade leishmanicida *in vitro* frente a formas promastigotas de diferentes espécies de leishmania, enquanto o alcaloide γ -farigina, quando testado *in vivo* em camundongos Balb/c infectado com *L. amazonensis* através de tratamento oral, reduziu a carga parasitaria na lesão em torno de 97% (FERREIRA et al., 2007).

Tanaka et al. (2007), testou o alcaloide indólico monoterpênóides ramiflorina (8) isolado de *Aspidosperme ramiflorum*, e este exibiu atividade contra formas promastigotas de *L. amazonensis* (CL₅₀= 10,5 μ M). O alcaloide esteroidal holamina (9), isolado de *Halarrhena curtissi*, exibiu atividade significativa contra formas promastigotas de *L. donovani* (CI₅₀=1,23 μ M) (KAM et al., 1998). E os alcaloides quinolonas, 2-*n*-propylquinolina-5, chimanina-*D* (10) e chimanina (11), isolados de *Galipea longiflora* (Rutaceae), exibiram atividade leishmanicida contra formas promastigotas de *L. braziliensis* com percentuais de inibição de aproximadamente 90% (SUNDAR et al., 2007).

Oriundos de organismo marinhos, os alcaloides renieramicina (12), isolado de *Neopetrosia* sp., e araguspongina (13), isolado da esponja marinha *Haliclona exígua*, apresentaram atividade leishmanicida frente a formas promastigotas de *L. amazonensis* (NAKAO et al., 2004; DUBE et al., 2007).

Figura 14 – Estruturas de alcaloides com potencial atividade leishmanicida.



Os flavonoides são metabolitos secundários, amplamente distribuídos em plantas, e classificados em seis grandes grupos: chalconas, flavonas, flavonóis, flavandiois, antocianinas e proantocianinas ou taninos condensados (FERREYRA, et al., 2012). Os flavonoides são utilizados pelos botânicos para classificação taxonômica. Eles regulam o crescimento das plantas e influenciam outras células biológicas de várias maneiras. Do ponto de vista farmacológico, os flavonoides possuem propriedades que inibem ou matam muitas estirpes bacterianas, inibem enzimas virais importantes, como transcriptase reversa e

protease, e destroem alguns protozoários patogênicos, conforme afirma Havsteen (2002).

Vários flavonoides foram identificados como promissores para o desenvolvimento de novos agentes leishmanicidas (Figura 15), como o flavonoide 7,4'-di-O-metilsoexutelbrina (14), isolado de *Sidastrum panucilatam*, que foi efetivo contra formas promastigotas de *L. brasiliensis* (TELES et al., 2015); e o flavonoide sakuranetina (15), isolado da espécie vegetal *Baccharis retura* que afetou significativamente o desenvolvimento de formas amastigotas de *L. chagasi*, *L. amazonensis*, *L. major* e *L. brasiliensis* (GRECCO et al., 2012).

Os flavonoides sintéticos 3-(3-Clorofenicol)1-6-(6-metoxi-2H-cromo-3-il)-prop-2-en-1-ona (16) e 3-(4-Clorofenicol)1-(6-metoxi-2H-cromo-3-il)-prop-2-en-1-ona (17), apresentaram atividade significativa frente a formas promastigotas de *L. major* com valores de $CI_{50}= 0,8 \mu M$ e $CI_{50}=0,7 \mu M$, respectivamente (FOROUMADI et al, 2010).

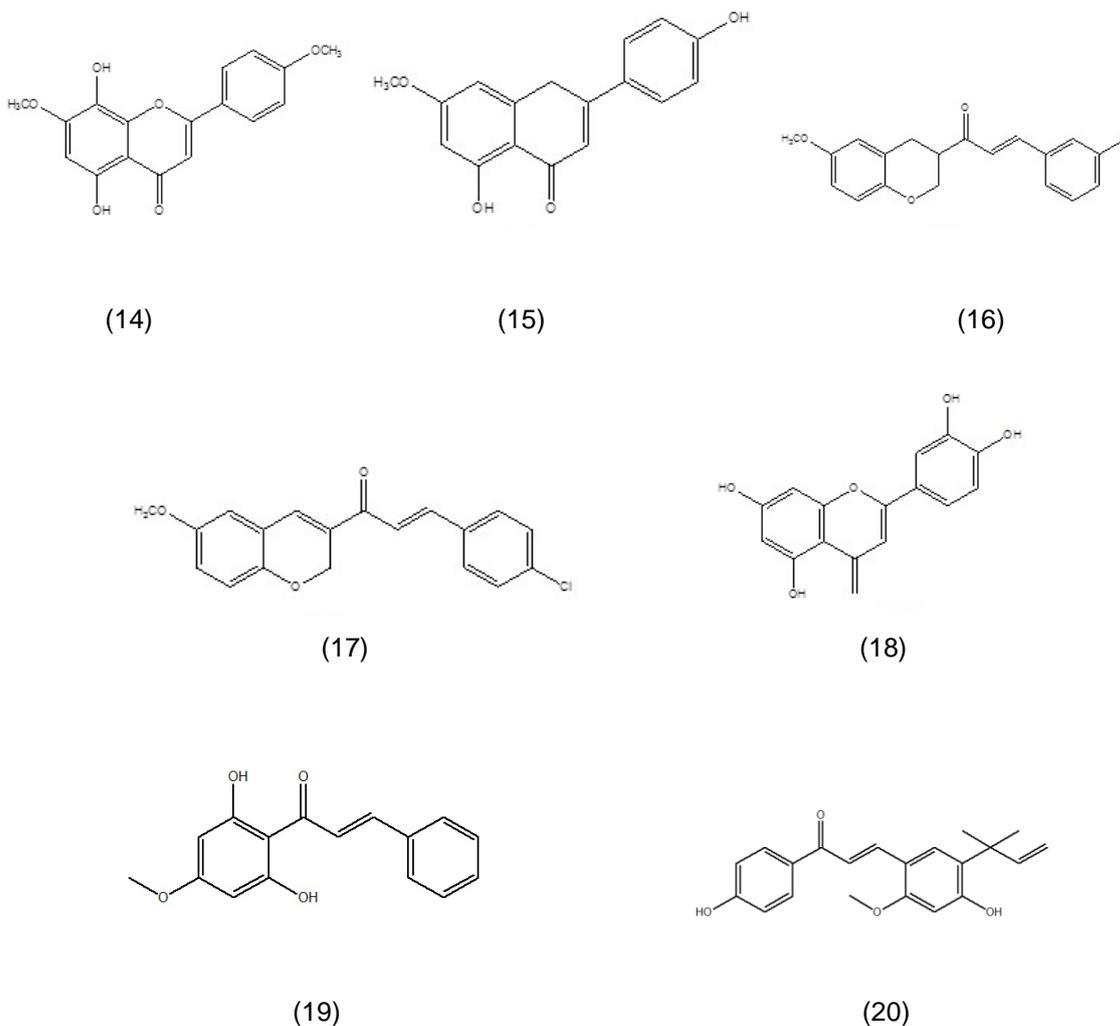
Em ensaios *in vivo* o flavonoide luteolina (18), isolado de *Vitex negundo*, foi capaz de reduzi em 80% a carga parasitaria de formas amastigotas de *L. chagasi* em baço de camundongos, quando administrado em doses de 3,5 mg/kg de peso corporal (SEN et al., 2006).

As chalconas são substâncias abundantemente presentes na natureza e têm um conjunto diverso de substituintes nos dois anéis aromáticos de 1,3-difenil-2-propenil-1-ona, que foi derivado pela clivagem do anel C em flavonoides. Dependendo do padrão de substituição nos dois anéis aromáticos, as chalconas apresentam uma vasta gama de atividades biológicas, incluindo leishmanicidas (Figura 15) (DHARN, 1981; DIMMOCK et al., 1999).

A chalcona 2',6'-diidroxí-4'-metoxichalcona (19), isolada de inflorescências de *Piper aduncum*, apresentou atividade significativa frente a formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, inclusive afetando a ultraestrutura mitocondrial do parasita sem induzir a produção de NO pelos macrófagos, e conseqüentemente a morte celular (CHEN et al., 1993). A licochalcona-A (20), uma chalcona oxigenada isolada das raízes de *Glycyrrhiza* sp. foi ativa frente a formas promastigotas de *L. major* e *L. donovani*, em ensaios *in vitro* (ZHAI et al., 1999); esse composto também preveniu o desenvolvimento de lesões em camundongos BALB/c infectados com *L. major*; e reduziu significativamente a carga parasitaria em baço e fígado de hamsters infectados

com *L. donovani*, além de afetar a cadeia respiratória do parasito sem afetar as organelas do macrófagos (CHENN et al., 2001).

Figura 15 – Estruturas de flavonoides com potencial atividade leishmanicida.

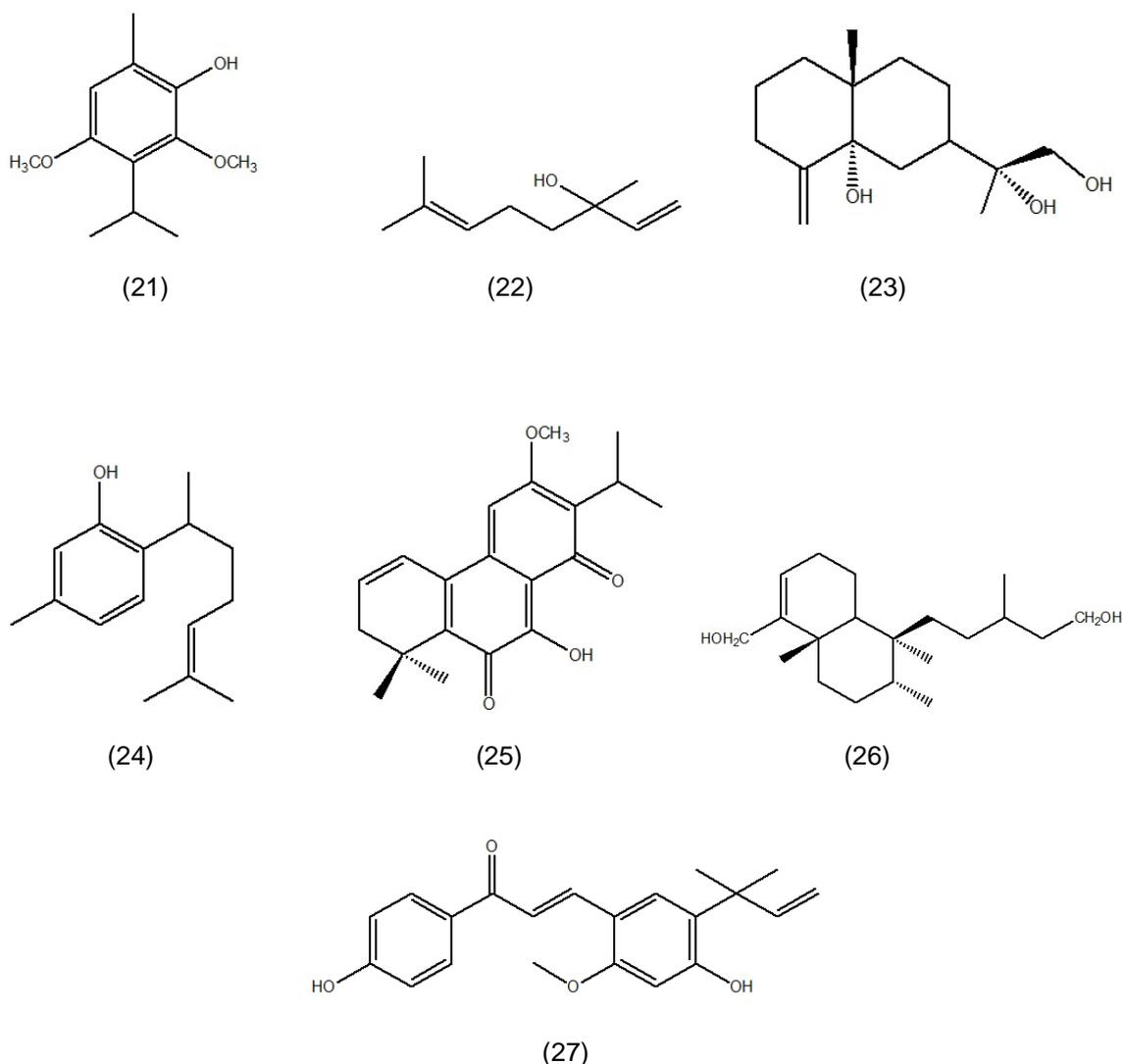


Os terpenóides são substâncias construídas a partir de isopreno, e por isso, eles também são chamados isoprenóides; são classificados de acordo com o número de resíduos de isopreno que contém (c-esqueleto), sendo assim denominados de: monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos, tetraterpenos e polyterpenos. Algumas substâncias que pertencem a essa classe de metabolitos têm suas atividades leishmanicidas constatadas (Figura 16).

O monoterpeno espintanol (21), isolados de extratos do caule de *Oxandra spintana* apresentou atividade leishmanicida frente a formas promastigotas de vinte espécies de leishmania; e em ensaios *in vivo* usando camundongos

infectados com *L. amazonensis*, os resultados foram equivalentes ao do fármaco padrão (HOCQUEMILLER et al., 1991). Outro monoterpeneo, o linalool (22), isolado de *Croton cajucara*, exibiu elevada atividade leishmanicida em ensaios *in vitro* contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, com valores de $CI_{50}= 20$ nM e $CI_{50}=143$ nM, respectivamente (DO SOCORRO et al., 2003). Usta e colaboradores (2009) sugerem que o linalool exerce atividade leishmanicida por destruição do cinetoplasto e saturação mitocondrial seguido de lise celular no parasita. O sesquiterpeneo Kudtrial (23) isolado das partes aéreas de *Jasonia glutinosa*, apresentou toxicidade para formas promastigotas de *L. donovani*, sendo esta atribuída, após estudos de SAR, a presença do grupo C-5-hidroxi em α -orientação (VILLAESCUSA-CASTILLO et al., 2000). A partir de estudos químicos da espécie de esponja *Myermekioderma styx*, o sesquiterpeneo curcufenol (24) foi isolado e testado sob formas promastigotas de *L. donovani*, e exibiu uma atividade leishmanicida significativa com $CE_{50}= 11,0$ μ M (GUL et al., 2007). O diterpeneo, 7-hidroxi-12-metoxi-20-nor-abieta-1,5(10)7,9,12-pentaen-6,14-diona (25), isolado de raiz de *Salvia cilicica*, apresentou significativa atividade leishmanicida em teste com formas promastigotas de *L. donovani* ($CI_{50}= 120$ nM) e *L. major* ($CI_{50}=180$ nM) (TAN et al., 2002). E o diterpeneo, 18-acetoxi-cis-clerod-3-en-15-ol (26), isolado de *Cistus monspeliensis*, exibiu atividade leishmanicida seletiva para formas promastigotas de *L. donovani* (FOKIALAKIS et al., 2006). O nor-triterpeneo, 6 α ,7 α ,15 β ,16 β ,24-pentacetoxi-22 α -carbometoxi-21 β ,22 β -epoxi-18 β -hidroxi-27,30-bisnor-3,4-secofriedela-1,20(29)-dien-3,4-*R*-olide (27), isolado de *Lophanthera lactescens*, exibiu promissora atividade leishmanicida frente a formas amastigotas de *L. amazonensis* ($CI_{50}= 0,50$ μ M); esse mesmo composto inibiu a sobrevivência do parasita em ensaios *in vivo* com curva dose-dependente de 12,71, 1,27 e 0,12 μ M, com percentuais de inibição de 75%, 55% e 46%, respectivamente (DANELLI et al., 2009).

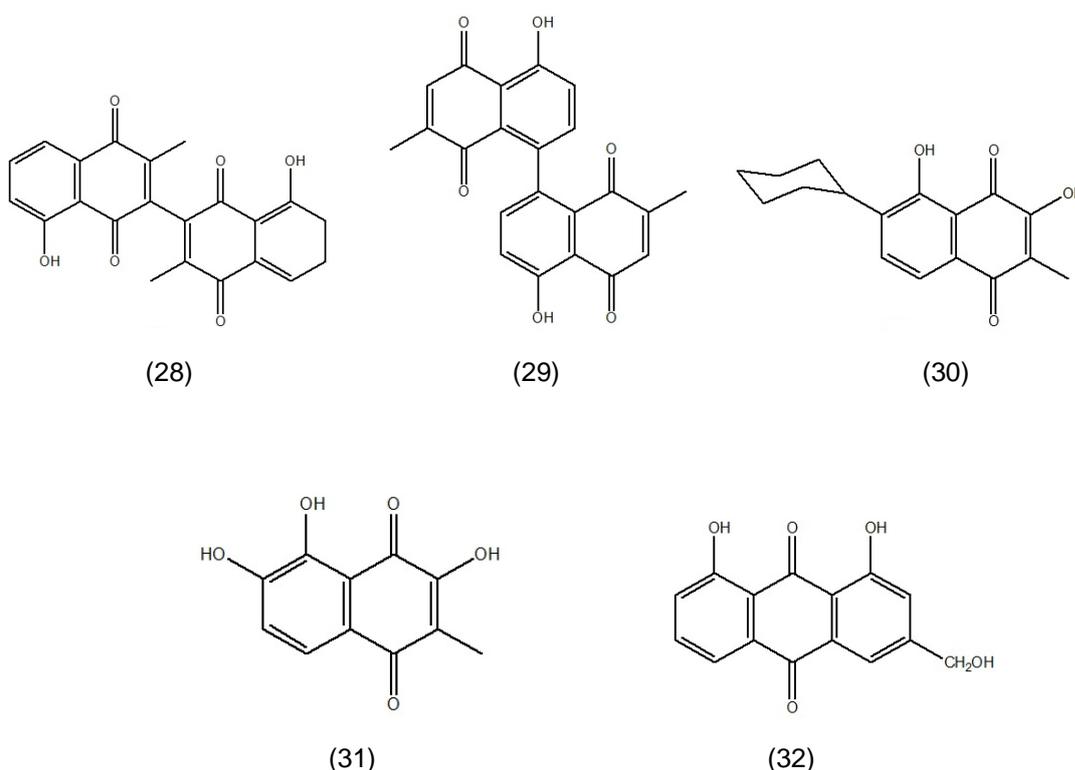
Figura 16 – Estruturas de terpenoides com potencial atividade leishmanicida.



As quinonas representam uma classe de compostos orgânicos que são formalmente "derivados de compostos aromáticos [tais como benzeno ou naftaleno] por conversão de um número par de grupos $-CH =$ em grupos $-C(=O)$ com qualquer rearranjo necessário de ligações duplas, resultando em uma estrutura de diona cíclica totalmente conjugada. As quinonas naturais são amplamente distribuídas, podendo ser encontradas desde ouriços do mar até cascas e raízes de vegetais, apresentam uma grande variedade estrutural, e uma gama de atribuições farmacológicas, como atividades antitumoral, antioxidante, antimicrobiana e parasitária, por exemplo (Figura 17) (THOMSON, 1971).

As naftoquinona dimericas, 3,3'-biplumbagina (28) e 8,8'-biplumbagina (29), isolado de cascas de caule de *Pera benensis*, apresentou significativa atividade sobre formas amastigotas de *L. brasiliensis*, *L. amazonensis* e *L. donovani* (MORI-YASUMOTO et al., 2012). A Dioncoquinones A (30) e B (31), isoladas de *Triphyophyllum peltatum*, exibiu uma boa e seletiva atividade frente a formas promastigotas de *L. major*; essas quinonas também foram testadas frente a formas amastigotas de *L. major* e promoveram 79,2% na inibição do crescimento. Outra quinona denominada aloe-emodina (32), uma antraquinona isolada das partes áreas de *Stephania dinklgei*, exibiu atividade frente a formas promastigotas e amastigotas de *L. donovani* (CAMACHO et al., 2000; SEMWAL et al., 2010).

Figura 17 – Estruturas de quinonas com potencial atividade leishmanicida.



6. DNA Topoisomerase: definições, estrutura e funcionamento.

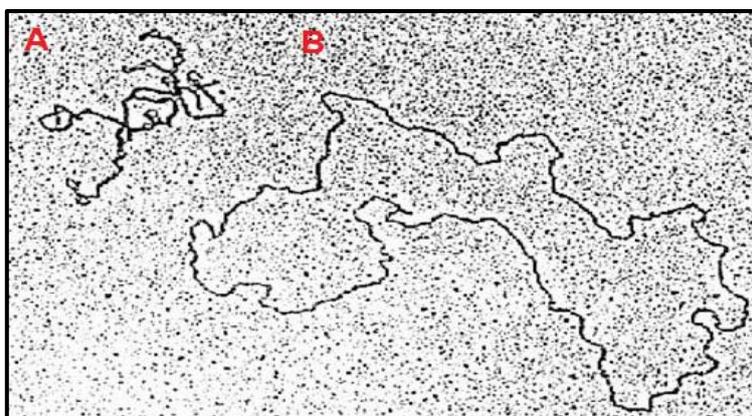
6.1. Estrutura molecular, funcionamento e restrições topológicas do DNA.

O DNA é o material genético da célula. Ele carrega as informações que serão transmitidas na reprodução celular e na formação de novos indivíduos. Regiões específicas de DNA são transcritos para produção dos diferentes tipos de RNA, os quais participam da síntese das cadeias polipeptídicas (VOLOGODSKII; COZZARELLI, 1994).

A longitude do DNA pode ser mil vezes maior que as dimensões de uma célula. Assim, em geral, o genoma completo de uma célula encontra-se empacotado dentro do núcleo da célula. Considerando que o diâmetro médio é de 6 μM , o DNA precisa retorcer sobre si mesmo aproximadamente mil vezes (PRADA et al., 2013a).

No ano de 1965 o pesquisador Vinograd e seus colaboradores identificaram como uma molécula de DNA circular, sob certas condições experimentais, adquiria uma conformação compacta e que girava sobre si mesmas várias vezes (Figura 18). Esta forma topológica do DNA recebeu o nome de superenovelado (do inglês *supercoiled*), em contrapartida a estrutura topológica não retorcida foi denominada de relaxada (do inglês *relaxed*).

Figura 18 – Fotografia de microscopia eletrônica dos estados topológicos do DNA. (A) estado topológico superenovelado; (B) estado topológico relaxado.

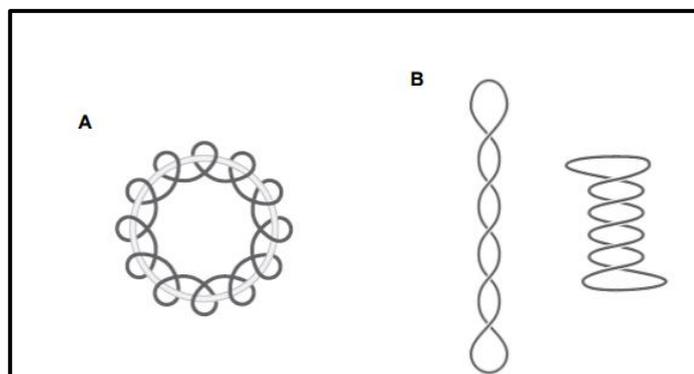


Fonte: (VINOGRAD et al; *Proceedings of Academy Sciences USA*, v.53, 1965).

Nos organismos procariotas o DNA apresenta um estado superenovelado plectomênico, o que permite que seu genoma se organize em pequenos cromossomos circulares fechados; de maneira oposta, nos eucariotos, o superenovelamento se produz em forma solenoide ou toroidal, o que facilita a

ação das histonas ajudando a uma compactação mais efetiva do DNA (Figura 19) (VOLOGODSKII; COZZARELLI, 1994).

Figura 19 – Modelo ilustrativo da estrutura toroidal (A) e da estrutura plectonêmica (B).



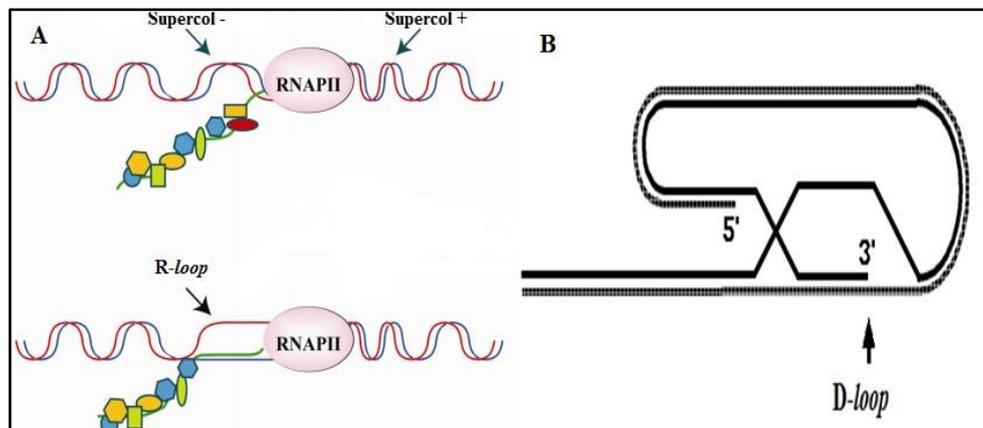
Fonte: (TRAVERS; MUSKHELISHVILLI, *EMBO Reports*, v.8, 2007).

A integridade e a organização física do DNA devem ser mantidas em todo momento para garantir a sobrevivência das células. Entretanto, muitos processos essenciais causam problemas na estrutura topológica do DNA, especialmente, aqueles relacionados como a separação das fitas de DNA nos processos de transcrição e replicação do genoma (LINDAHL, 1993). Dado que o DNA possui uma estrutura de dupla hélice e carece da capacidade de girar livremente no interior das células, quando ocorre a separação das fitas pelo complexo polimerase-helicase são gerados superenovelamentos nas regiões flanqueadas. Como resultado, são formados superenovelamentos positivos em frente aos lugares de replicação ou transcrição, e superenovelamento negativos por trás destes lugares (RICHMOND; DAVEY, 2003).

Com o objetivo de manter a integridade da estrutura topológica do DNA, as enzimas topoisomerases agem diretamente nos superenovelamento positivos detendo de forma quase imediata os processos de replicação e transcrição, enquanto que os superenovelamentos negativos favorecem a formação de estruturas atípicas do DNA (Figura 20), tais como *D-loops* (onde duas cadeias em dupla hélice são separadas num trecho e afastadas por uma terceira cadeia de DNA) e *R-loops* (onde se forma uma estrutura de ácido nucléico de três cadeias, no qual se mantém ancorado um híbrido de RNA-RNA ao seu DNA

molde) (VIARD; TOUR, 2007; POMIER, 2009; POMIER et al., 2010; MONTECUCCO;BIAMONTI, 2013).

Figura 20 – Modelo ilustrativo de formação de (A) R-loops e (B) D-loops durante o processo de replicação do DNA.



Fonte: (MONTECUCCO; BIAMONTE, *Frontiers in genetics*, v.4, 2012); (Greider, *Cell*, v.97,1999).

6.2. A DNA topoisomerase

As topoisomerases são enzimas nucleares que desempenham papéis essenciais na replicação do DNA, na transcrição, na segregação cromossômica e na recombinação. Elas compõem a maquinaria molecular encarregada de controlar o estado topológico do DNA nas células (NITISS et al., 2012; BALAÑA-FOUCE et al., 2014). Todas as células contêm duas formas principais de topoisomerase, tipo I (TopI), que faz cortes de cadeia simples no DNA, e tipo II (TopII), que corta as duas fitas de DNA. (DAS et al., 2007). Todas elas são proteínas responsáveis pelo relaxamento do DNA superenovelado cuja ação é através de cortes em uma ou ambas as fitas que formam a dupla hélice do DNA (DAS et al., 2004a; DEXHEIMER; POMMIER, 2008). A atuação da TopI é ATP-independente, enquanto a TopII necessita de ATP para quebrar as cadeias de DNA. As diferenças no modo de ação apontam que a TopI está exclusivamente envolvida no relaxamento do DNA superenovelado e a TopII, além do relaxamento do DNA superenovelado, são responsáveis pela catenação e

decatenação do DNA (CHAMPOUX, 2001; WANG et al., 2002; CRETAIO et al., 2007; POMMIER et al., 2010).

A topoisomerase do tipo I é subdividida em dois subgrupos mecanicamente distintos; a enzima do tipo IA, que são homólogas à enzima topoisomerase I de *E. coli*, e as enzimas do tipo IB, que são homólogas à topoisomerase I humana; estas enzimas são capazes de relaxar o DNA superenovelado e decatenar o DNA interligado. A topoisomerase II, pode introduzir superespirais negativos no DNA, e esta subdividida em dois subgrupos: TopIIA e TopIIB. Além das TopI e TopII, a família das enzimas topoisomerase inclui ainda a TopIII e a TopIV, sendo esta última descrita para uma única espécie de arquea *Methanopyrus kandleri* (Tabela 3) (SLESAREV et al., 1993; WANG et al, 2002; FORTERRE et al., 2007).

Tabela 3 – Características e diferenças entre as quatro famílias da enzima topoisomerase.

	Tipo I		Tipo II	
	TopIA	TopIB	TopIIA	TopIIB
Domínio ATPase	Não	Não	Sim	Sim
Dependência metálica	Mg ²⁺	Não	Mg ²⁺	Mg ²⁺
Ruptura de DNA	Cadeia simples		Cadeia Dupla	
Polaridade de ruptura	5'	3'	5'	5'
Δ LK	+ 1	\pm 1	\pm 2	\pm 2
Enzimas	TopI, TopII, girase reversa	TopI, TopIV	TopII, girase	TopIV

Fonte: (SLESAREV et al, *Nature*, v.364, 2014).

As topoisomerases funcionam através de reações catalíticas as quais são divididas em três etapas: (i) ligação da enzima ao substrato de DNA; (ii) quebra da cadeia por uma reação de transesterificação acompanhada pela formação de uma ligação fosfodiéster transitória entre o resíduo de tirosina do centro ativo e

as terminações no local de corte do DNA; (iii) religações das terminações clivadas e libertação da enzima (KROGH; SHUMAN, 2000; DAS et al., 2006; 2008). Em condições fisiológicas, os complexos enzima-DNA são intermediários fugazes que estão presentes em baixas concentrações, toleráveis pela célula. Destarte, se o número de quebras de cadeia for elevado ou muito reduzido, podem suceder efeitos deletérios irreversíveis, assim, as topoisomerases possuem uma dualidade inerente ao catalizarem as reações fundamentais para célula, mas simultaneamente, tem a capacidade de infligir danos irreparáveis no genoma do organismo (DAS et al., 2008; BUGREEV; NEVINSKY, 2010).

6.3. Diferenças estruturais entre as topoisomerases de leishmania e humana.

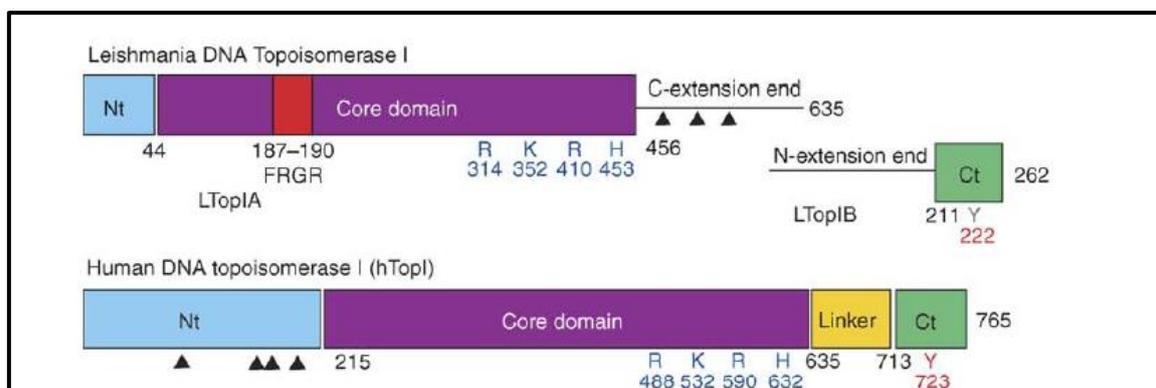
O avanço dos estudos na área de genômica permitiu uma visualização geral de aspectos relevantes da organização do genoma de *Leishmania* spp., e com isto a aquisição de informações que podem ser usadas para melhorar a compreensão da biologia, patogênese e questões importantes acerca da interação hospedeiro-parasita (TOLEDO et al., 2010; ALCOLEA et al., 2011). Como por exemplo, a descoberta de que o conteúdo e organização genômica das espécies *Leishmania major*, *Leishmania braziliensis* e *Leishmania infantum* são altamente similares (TOLEDO et al., 2010). Assim, as novas abordagens de alto rendimento nos níveis de Genoma, Transcriptoma e Proteoma permitiu conhecer não só as diferenças estruturais observadas entre o genoma de cinetoplastídeos e de humanos, como também a similaridade genética entre as diferentes espécies de leishmania, abrindo um atrativo caminho de investigação para intervenção quimioterápica (ZHANG et al., 2006; KAZEMI, 2011).

Com o advento da biologia molecular e suas técnicas foi possível a descoberta de vários tipos de DNA topoisomerase o que permitiu uma compreensão mais profunda do seu importante papel nas células vivas; propiciando visualizar que as funções biológicas das topoisomerases estão profundamente enraizadas na estrutura da dupla hélice do DNA. Essas mesmas técnicas permitiram também evidenciar que, embora cataliticamente, as funções sejam homólogas a variação estrutural das topoisomerases entre os organismos, tornam essas enzimas importantes promotoras de marcadores moleculares para

a descoberta e desenvolvimento de novos fármacos antitumorais, antimicrobianos e antiparasitários de extrema seletividade (VILLA, et al., 2003; DAS et al, 2004; FORTERRE et al., 2007; BAX et al., 2010, POMMIER et al., 2006).

A primeira sequência descrita de topoisomerase em leishmania foi da TopI de *L. donovani* por Broccoli e colaboradores (1999), isto permitiu observar uma estreita homologia com o domínio central das topoisomerases tipo IB de outros eucariotas, entretanto diferenças estruturais são notáveis; enquanto as TopI bacterianas, virais e humanas são codificadas por um gene que contém dois domínios conservados (ligação ao DNA e centro ativo), nos cinetoplastídeos, a TopI é codificada por dois genes que dão origem a um topoisomerase I heterodimérica (Figura 21) (BALAÑA-FOUCE et al., 2006; GONZALÉS et al., 2007; DAS et al., 2008; PRADA et al., 2013c).

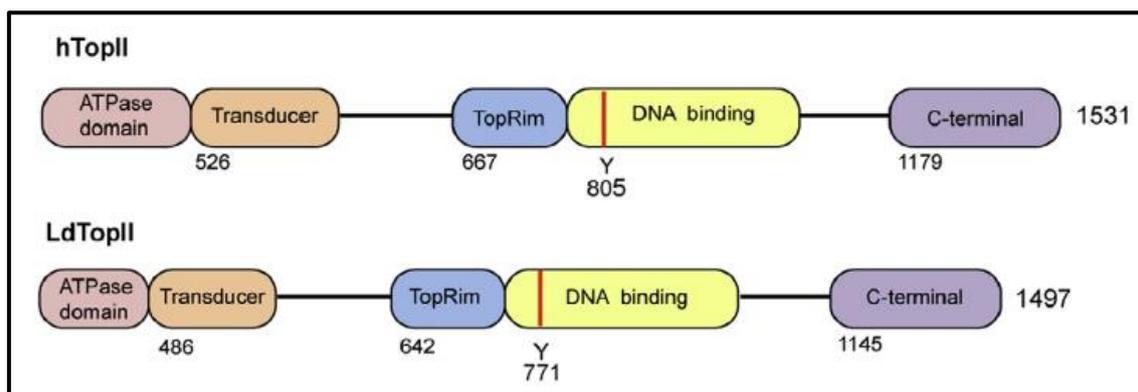
Figura 21 – Diferenças estruturais entre TopI de *Leishmania* sp. e TopI humana.



Fonte: (BALAÑA-FOUCE et al., *Drug Discovery Today*, v.4, 2006).

Os genes da topoisomerase II de kinetoplastídeos foram isolados e sequenciados em *L. donovani*, *L. infatum* e *L. chagasi*, sendo verificado que estes genes e respectivas proteínas são menores que as suas homologas nos mamíferos (Figura 22) (SENGUPTA et al., 2005; DAS et al., 2006b; JENSEN; ENGLUND; 2012).

Figura 22 – Diferenças estruturais entre TopII humana e TopII de *Leishmania* sp.

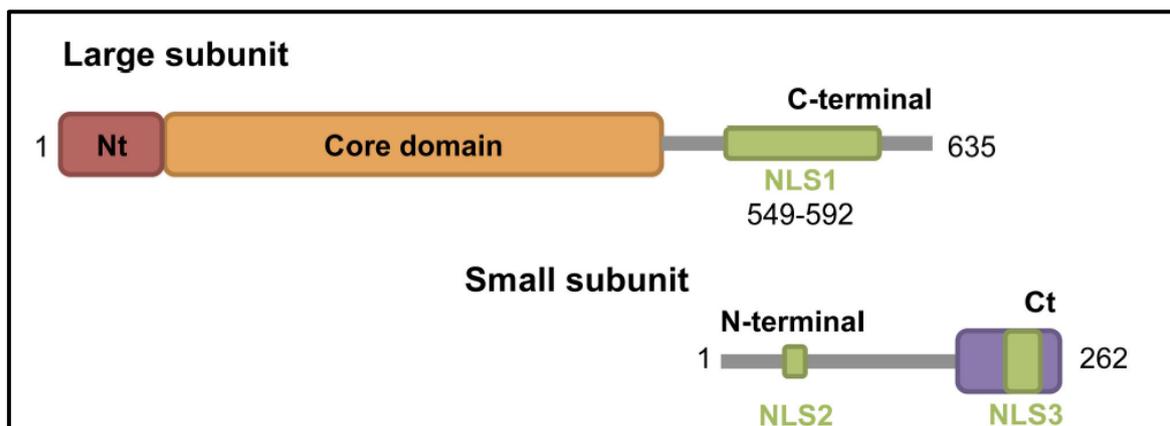


Fonte: (BALAÑA-FOUCE et al., *Drug Discovery Today*, v.4, 2006).

Uma vez conhecida a organização do genoma de *Leishmania* foi possível observar que a enzima TopIA não possuía genes ortólogos (genes diferentes em espécies diferentes, mas com a mesma função) em eucariotos; isso fez da enzima TopIB um atrativo alvo de intervenção quimioterápica, principalmente em virtude das diferenças estruturais entre a TopIB humana, como já apresentado nos parágrafos anteriores (GONZÁLEZ et al., 2007; GARCIA-ESTRADA et al., 2010).

A intensificação das pesquisas com a TopIB permitiu determinar que essas enzimas, em virtude da codificação por um gene, contém domínios de ligação e catalíticos com o DNA, altamente conservados em um único peptídeo; além de identificar um gene para uma grande subunidade, denominado de LdTopIL, no cromossoma 34 de *Leishmania donovani*, codificado para 635 polipéptido de aminoácido com uma massa molecular estimada de 73 kDa, esta subunidade é estreitamente homóloga ao domínio nuclear da topoisomerase I humana; foi identificado também um gene para uma pequena subunidade, denominada LdTopIS, que codifica 262 aminoácidos com uma massa molecular prevista de 28 kDa, encontrado no cromossoma 4 de *L. donovani* (Figura 23) (DAS et al., 2008; PRADA et al., 2013c).

Figura 23 – Diferenças estruturais entre LdTopIB subunidade larga (LdTopIL) e subunidade pequena (LdTopIS).



Fonte: (PRADA et al., *PlosOne*, v.8, 2013c).

Desde seu descobrimento em 1970, as enzimas TopIB se tornaram potenciais alvos de intervenção terapêutica, devido principalmente ao seu relevante papel na preservação da informação genética e na manutenção filogenética da sua estrutura, fazendo com que as substâncias destinadas a sua inibição, não apresentem seletividade entre as enzimas do hospedeiro e do parasito. Particularmente, a TopIB de leishmania é uma destacável exceção, já que difere profundamente da enzima dos mamíferos, tanto na sua estrutura como em seu nível de expressão, o que permitiu abrir uma nova linha de desenho de moléculas que atuem especificamente sobre a célula parasitária (DAS et al., 2004; DÍAZ-GONZÁLEZ et al., 2008).

Para facilitar as pesquisas utilizando TopIB como alvo para o desenvolvimento de novas drogas leishmanicidas, Das e colaboradores (2004b) realizaram estudos *in vitro* com o objetivo de reconstituir as proteínas LdTopIL e LdTopIS e assim obter em larga escala a LdTopIB recombinante. Para isso as proteínas foram purificadas a partir de extrato bacteriano e a atividade foi mensurada através do ensaio de relaxamento do DNA plasmidial. Outro estudo foi realizado por González et al. (2007) com o mesmo objetivo, entretanto, esses pesquisadores utilizaram um sistema de expressão com cepas de *Saccharomyces cerevisiae* deficiente de topoisomerase (enzima dispensável para a sobrevivência desta levedura), para obter proteínas recombinantes LdTopIB.

Atualmente o uso de proteínas LdTopIB recombinante procedentes de cultivos sobre-expressantes de *S. cerevisiae* e *E. coli* é amplamente aplicável e adotável em pesquisas que investigam a ação seletiva, em LdTopIB, de substâncias naturais, sintéticas e semissintéticas que são potencialmente candidatas a fármacos leishmanicidas (TEJERÍA et al., 2016; SAHA et al., 2016; D'ANNESSA et al.; 2015).

6.4. A TopIB como alvo quimioterápico para leishmanioses

A identificação de alvo específico em via-metabólica para o parasito, no qual as diferenças no metabolismo e na seleção de vias ou enzimas, que exercem um alto nível de controle metabólico no parasito e um baixo nível de controle metabólico no hospedeiro, são fatores que determinam a especificidade e conseqüentemente a eficácia do fármaco planejado, sendo, portanto, fundamentais para o desenvolvimento de novos agentes leishmanicidas (TURABEKOVA et al., 2011; MELOS; ECHEVERRIA, 2012; MICHELETTI; BEATRIZ, 20012).

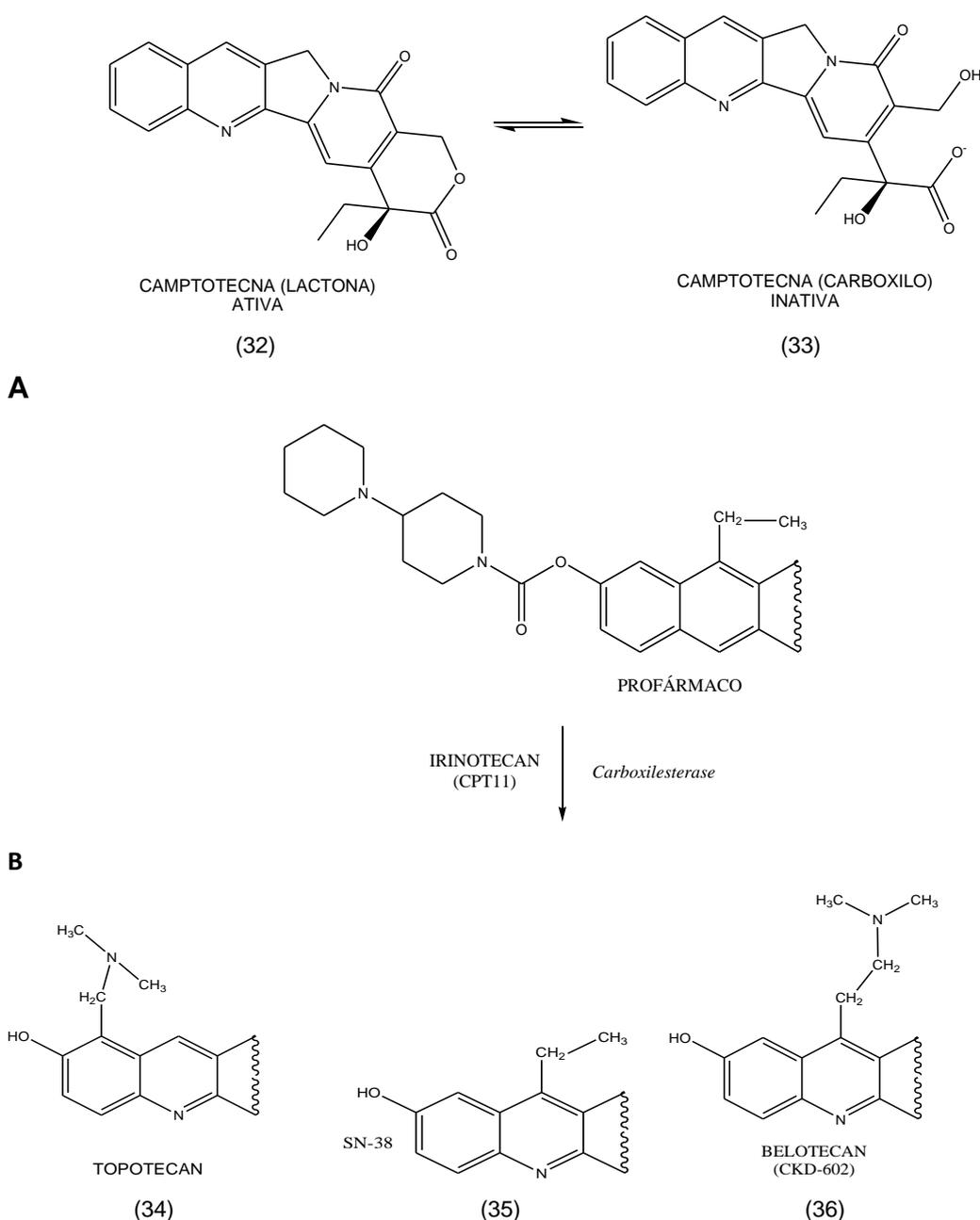
De acordo com Prada et al. (2013a), as enzimas topoisomerasas para realizarem suas funções fisiológicas geram cortes transitórios no DNA. Conseqüentemente, essas enzimas se apresentam muito vulneráveis a determinadas condições de estresses fisiológicos, como por exemplo, a exposição a inibidores, pH ácido e estresse oxidativo, convertendo essas enzimas em endonucleases que rompem o DNA, resultando na instabilidade genômica e/ou morte da célula por necrose ou apoptose.

Neste contexto a TopIB de leishmania apresenta-se como uma via potencial para o desenho de moléculas leishmanicidas, uma vez que difere consideravelmente do seu hospedeiro mamífero, além de apresentar um grau de expressão genética diferente durante o processo de proliferação (SOUSA et al., 2003; DAS et al., 2006).

Classicamente os inibidores de TopIB são classificados em duas categorias: (i) os compostos que estabilizam os complexos de excisão entre enzima e DNA, esses são denominados de inibidores classe I ou inibidores enzimáticos; e (ii) compostos que interferem na função catalítica da enzima, esses são denominados de inibidores classe II (POMIER et al., 2006).

A camptotecina (32) (CPT) e seus análogos estruturais (Figura 24) são os melhores exemplos de inibidores enzimáticos de classe I, eles são capazes de clivar de forma específica e irreversível os complexos de clivagem (CL) (POMIER et al., 2006). Segundo Brandão et al. (2010), os CL são responsáveis pela expansão do relaxamento do DNA, impedindo o religamento da fita de DNA clivada pela TopI, de modo que a fita permanece clivada por períodos indetectáveis, favorecendo modificações no DNA e apoptose celular (Figura 25).

Figura 24 – Camptotecina (CPT) e alguns de seus análogos aprovados para uso clínico (A) e em fase clínica (B).



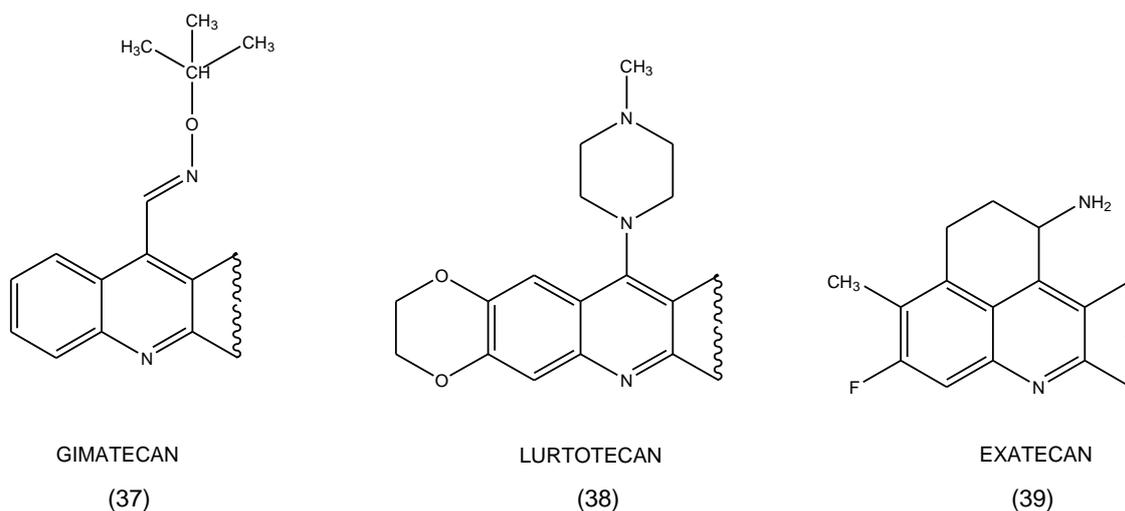
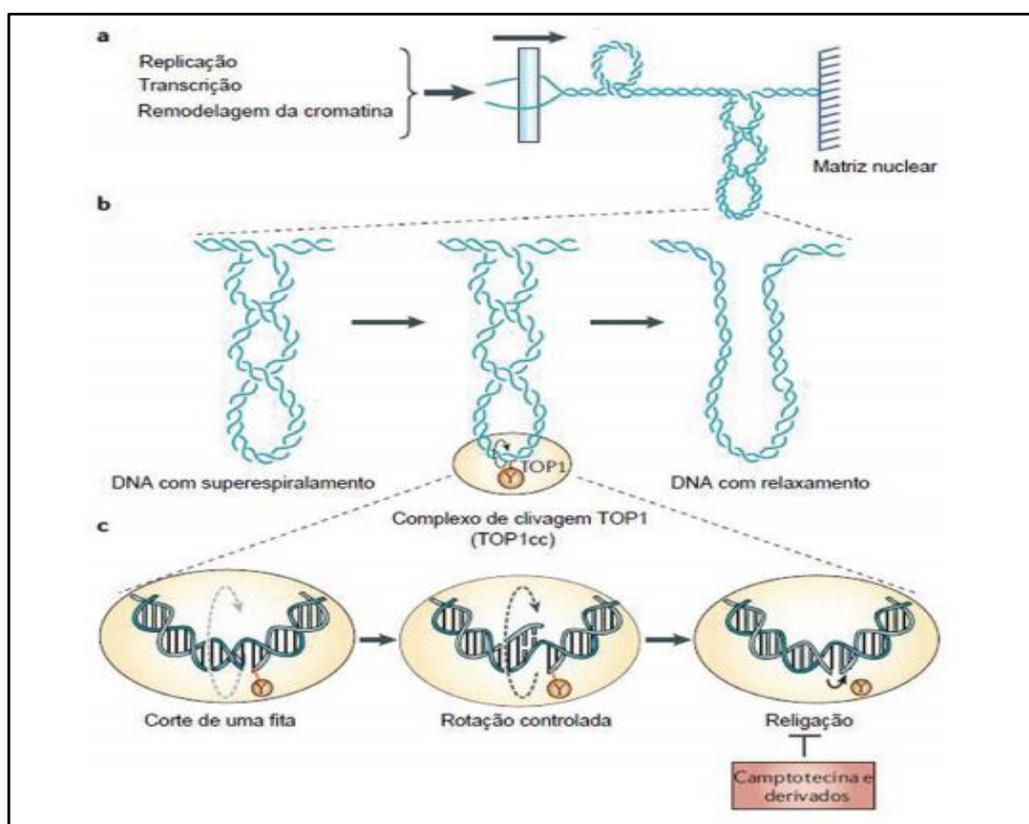


Figura 25 – Ação da camptotecina e seus derivados sobre DNA.



Fonte: (BRANDÃO et al., *Química nova*, v.33, 2010).

Nos últimos quinze anos a Top1B de leishmania vem sendo investigada como via metabólica para entendimento dos mecanismos de ação de substâncias naturais, sintéticas e semissintéticas promissoras para o desenvolvimento de fármacos leishmancidas (Figura 26). O estudo de Chowdhry

et al. (2003), concluiu que o ácido diidrobetulinico (40) induziu a inibição da atividade de TopIB de *L. donovani*, em concentrações variando de 20-100 μM , com percentuais de 92%, o que foi determinante para morte celular por apoptose, fato constatado através de ensaio *in vivo* com camundongos Balb/c.

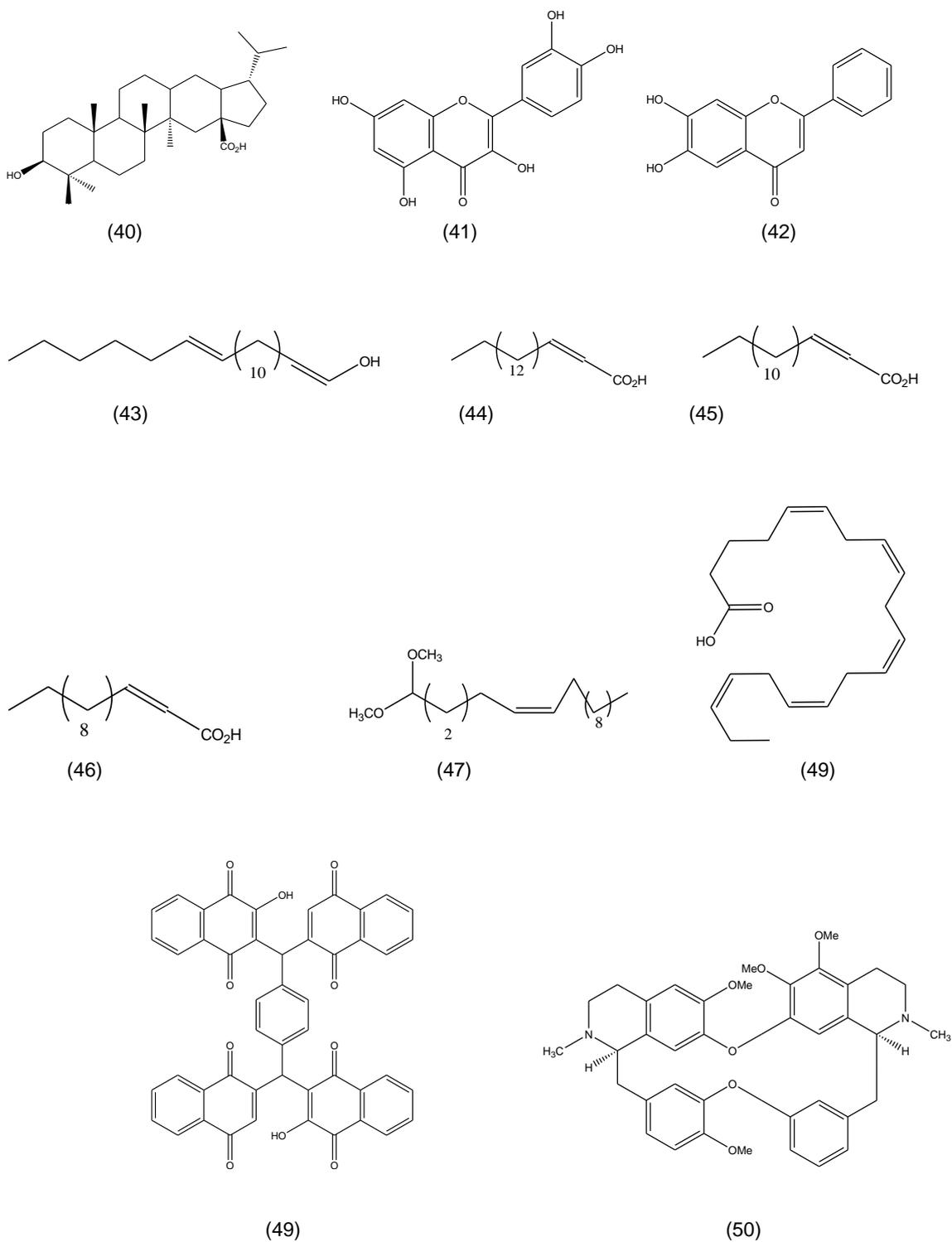
Jean-Moreno et al. (2006), observou a ação inibitória de quercetina (41) e colalina (42), observando inibição da atividade de LdTopIB de *L. donovani* a 512 μM . Outros flavonoides como luteolina (18) e baicalina (43), também foram testados como inibidores de LdTopIB, e apresentaram inibições significativas da atividade enzimática (DAS et al., 2006).

O ácido (*Z*)-17-metil-13-octadecenoico (44), isolado do organismo marinho *Polymastia penicillus*, foi capaz de inibir a atividade de LdTopIB de *L. donovani* a 50 μM (CARBALLEIRA et al, 2009). Os ácidos sintéticos 2-octadecinoico (45), 2-hexadecinoico (33) e 2-tetradecinoico (46) se apresentaram como inibidores de LdTopIB de *L. donovani* (CARBALLEIRA et al., 2012a). O ácido (\pm)-2-metoxi-6*Z*-heptadecenoide (47) foi seletivo quanto a inibição de LdTopIB (50-75 μM) (CARBALLEIRA et al., 2012b). O ácido conjugado eicosapentaenóico (48), inibiu a atividade enzimática TopIB de *L. donovani* a 50 μM (VASSALO et al., 2011).

Sharma e colaboradores (2014), usaram análogos sintéticos de Bis-lawsona (49), em ensaios de relaxamento de DNA ATP-independente, para investigar a ação inibitória destes compostos sob a atividade de LdTopIB de *L. donovani*, e observaram redução da atividade enzimática em torno de 80%. Kumar et al. (2016), testou alcaloide Bis-benzilisoquilona (50), isolados de *Thalictrum folialosum* e observou inibição da atividade de LdTopIB (50 μM) de *L. donovani*.

Recentemente, Prada et al. (2013b), utilizando dois fármacos inibidores de TopIB, camptotecina e gimatecam, cujo estudos são voltados para inibição de hTopIB, investigou a atividade leishmanicida desses fármacos sob formas promastigotas ($\text{CI}_{50}=1,12 \mu\text{M}$) e amastigotas ($\text{CI}_{50}=0,03 \mu\text{M}$) de *L. infantum*. Estes fármacos também foram testados sobre a atividade de LdTopIB, em concentrações variando de 0,08-0,16 μM , obtendo elevados percentuais de inibição; os dados obtidos pelo grupo tornam esses fármacos drogas promissoras no tratamento das leishmanioses.

Figura 26 – Estruturas de substâncias com potencial atividade inibidora sobre enzima topoisomerase de *Leishmania* sp.



7. Perspectivas para o desenvolvimento de fármacos leishmanicidas

A falta de interesse da indústria farmacêutica no desenvolvimento de novos fármacos leishmanicidas, faz com que esta doença seja em geral tratada com medicamentos pouco eficazes e com alta toxicidade aguda. Neste contexto os produtos naturais apresentam-se como substratos para obtenção de derivados com características químicas que os tornam mais eficazes e menos tóxicos; além de investimento de novas formulações farmacêuticas e liberação controlada de fármacos, e combinações de fármacos já utilizados, ofertando novas propostas para velhos conhecidos (MICHELETTI; BEATRIZ, 2012; MELOS; ECHEVARRIA, 2012).

Desta forma, ampliar o arsenal de medicamentos para as leishmanioses é uma tarefa premente dos governos e nações que sofrem com esta enfermidade tropical, devendo ser oferecidas condições de ampliar as pesquisas básicas e clínicas e assim permitir o desenvolvimento de agentes terapêuticos mais eficazes e com reduzidos efeitos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGALLOU, M.; MARGARONI, M.; KARAGOUNI, E. Cellular vaccination with bone marrow-derived dendritic cells pulsed with a peptide of *Leishmania infatum* KMP-11 and CpG oligonucleotídeos induces protection in a murine model of visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v.29, p.5053-5064, 2011.

ALCOLEA, P. J.; ALONSO, A.; LARRAGA, V. Proteome profiling of *Leishmania infatum* promastigotes. **The Journal Eukaryotic Microbiology**, v.58, n.4, p.352-358, 2011.

ALEXANDER, J., BRYSON, K. T helper (h)1/Th2 and Leishmania: paradox rather than paradigm. **Immunology Letters**, v.99, p.17–23, 2005.

ÁLVAREZ, A. M. M. Leishmaniasis. Aspectos de interés sobre un parasitismo exótico para Cuba Leishmaniasis: Interesting features on exotic parasitism for Cuba. **Revista Cubana de Higiene y Epidemiología**, v.48, n.1, p.78-92, 2010.

AMATO, V. S.; PADILHA, A. R. S.; NICODEMO, A. C.; DUARTE, M. I. S.; VALENTINI, M. UIP, D. E.; AMATO, V. N. Use of itraconazole in the treatment of mucocutaneous leishmaniasis: a pilot study. **International Journal of Infection Diseases**, v.4, n.3, p.153-157, 2000.

ANTINORI, S., SCHIFANELLA, L., CORBELLINO, M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases**, v.31, n.2, p.109-118, 2012.

ARAÚJO, C. A. C.; ALEGRIO, L.V.; LEON, L. L. Antileishmanial activity of Compounds extracted and characterized from *Centropogon sclerophyllon*. **Phytochemistry**, v.49, n.3, p.751-754, 1998.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **International Journal for Parasitology**, v.30, n.12/13, p. 1269-1281, 2000.

BAIOCCO, P.; COLOTTI, G. FRANCESCHINI, S.; ILARI, A. Molecular Basis of Antimony Treatment in Leishmaniasis. **Journal Medicinal Chemistry**, v. 52, p.2603–2612, 2009.

BALAÑA-FOUCE, R., GARCÍA-ESTRADA, C., PÉREZ-PERTEJO, Y., REGUERA, R.M. Gene 875 disruption of the DNA topoisomerase IB small subunit induces a non-viable 876 phenotype in the hemoflagellate *Leishmania major*. **BMC Microbiology**, v.8, p.113-121, 2008.

BALAÑA-FOUCE, R., PRADA, C.F., REQUENA, J.M., CUSHMAN, M., POMMIER, Y., ÁLVAREZ-VELILLA, R., PRADA, C.F., PÉREZ-PERTEJO, Y., REGUERA, R.M. Indotecan (LMP400) 879 and AM13-55: two novel indenoisoquinolines show potential for treating visceral leishmaniasis. **Antimicrobial Agents Chemotherapeutic**, v.56, p.5264–5270, 2012a.

BALANÑA-FOUCE, R., REGUERA, R. M., CUBRÍA, J. C., ORDÓÑEZ, D. The pharmacology of leishmaniasis. **General Pharmacology: The Vascular System**, v.30, n.4, p.435-443, 1998.

BALANÑA-FOUCE, R.; ÁLVAREZ-VELILLA, R.; FERNANDEZ-PRADA, C.; GARCIA-ESTRADA, C.; REGUERA, R. M. Trypanosomatids topoisomerase revisited new structural findings and role in drug Discovery. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drugs resistance**, v.4, p.326-337, 2014.

BALANÑA-FOUCE, R.; CÁLVO-ÁLVAREZ, E.; ÁLVAREZ-VELILLA, R.; PRADA, C. F.; PÉREZ-PERTEJO, Y.; REGUERA, R. M. Role of trypanosomatid's arginase in polyamine biosynthesis and pathogenesis. **Molecular Biochemistry Parasitology**, v.181, p.85-93, 2012b.

BALANÑA-FOUCE, R.; REDONDO, C. M.; PÉREZ-PERTEJO, Y.; DÍAZ-GONZÁLEZ, R.; REGUERA, R. M. Targeting atypical trypanosomatid and topoisomerase I. **Drug Discovery Today**, v.4, n.15/16, p.733-740, 2006.

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v.7, n.3, p.328-337, 2004.

BAX, D. B.; CHAN, P. F.; EGGLESTON, D. S.; FOSBERRY, A.; GENTRY, D. R.; GORREC, F.; GIORDANO, I.; HANN, M. M. HENNESSY, A. Type IIA topoisomerase inhibition by new class of antibacterial agents. **Nature**, v.466, n.19, p.935-944, 2010. doi:10.1038/nature09197.

BERN, C., CHOWDHURY, R. The epidemiology of visceral leishmaniasis in Bangladesh: prospects for improved control. **Indian Journal of Medical Research**, v.123, n.3, p.275-288, 2006.

BERN, C.; MAGUIRE, J. H.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to Leishmaniasis. **PlosOne Neglected Diseases**, v.2, n.10, p.e-313, 2008.

BESTEIRO, S., WILLIAMS, R. A., COOMBS, G. H., MOTTRAM, J. C. Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. **International Journal for Parasitology**, v.37, n.10, p.1063-1075, 2007.

BORJA-CABRERA, G. D.; SANTOS, F. N.; SANTOS, F. B.; TRIVELLATO, F. A.; KAWASAKI, J. K.; COSTA, A. C.; CASTRO, T.; NOGUEIRA, F. S.; MOREIRA, M. A.; LUVIZOTTO, M. C.; PALATNIK, M.; PALATNIK-DE-SOUZA, C. B. Immunotherapy with saponin enriched-Leishmuune[®] vaccine versus immunochemotherapy in dogs with natural canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v.28, p. 597-603, 2010.

BRANDÃO, H. N.; DAVID, J. P.; COUTO, R. D.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Química e farmacologia de quimioterápicos antineoplásicos derivados de plantas. **Química Nova**, v.33, n.6, p.1359-1369, 2010.

BROCCOLI, S.; MARQUIS, J.; PAPADOPOULOU, C.; OLIVIER, M.; DROLET, M. Characterization of *Leishmania donovani* gene encoding a protein that closely resembles a type IB topoisomerase. **Nucleic Acids Research**, v.27, n.13, p.2745-2752, 1999.

BUGREEV, D. V.; NEVINSKU, G. A. The structure and mechanism of the action of type-IB DNA topoisomerase. **Russian Journal of Bioorganic Chemistry**, v.36, n.3, p. 269-286, 2010.

CALVO-ÁLVAREZ, E.; GUERRERO, N. A.; ÁLVAREZ-VILELLA, R.; PRADA, C. F.; REQUERA, J. M.; PUNZÓN, C.; LLAMAS, M. A.; ARÉVELO, F. J.; RIVAS, L.; FRENO, M.; PEREZ-PETERJO, Y.; BALAÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R. M. Appraisal of *Leishmania major* strain stably expressing mCherry fluorescent protein for both *in vitro* and *in vivo* studies of potential drugs and vaccine against cutaneous leishmaniasis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.6, n.11, p.e-1927-e-1938, 2012.

CAMACHO, M. R.; KIRBY, G. C.; WARHUST, D. C.; CROFT, S. L.; PHILLIPSON, J. D. Oxoaporphine alkaloids and quinones from *Stephania dinklagei* and evaluation of their antiprotozoal activities. **Planta Medica**, v.99, n.5, p.478-480, 2000.

CARBALLEIRA, N. M.; CARTAGENA, M.; LI, F.; CHEN, Z.; PRADA, C. F.; CALVO-ÁLVAREZ, E.; REGUERA, R. M.; BALAÑA-FOUCE, R. First total synthesis of the (±)-2-methoxy-6-heptadecynoic acid and related 2-methoxylated analogs as effective inhibitors of the *Leishmania* topoisomerase IB enzyme. **Pure Applied Chemistry**, v.84, n.9, p.1867-1875, 2012a.

CARBALLEIRA, N. M.; CARTAGENA, M.; SANABRIA, D.; TASDEMIR, D.; PRADA, C. F.; REGUERA, R. M.; BALAÑA-FOUCE, R. 2-Alkynoic fatty acids inhibit topoisomerase from *Leishmania donovani*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v.22, p.6185-6189, 2012b.

CARBALLEIRA, N. M.; MONTANO, N.; BALAÑA-FOUCE, R.; PRADA, C. F. First total synthesis and antiprotozoal activity of (Z)-17-methyl-13-oxatadecenoic acid, a new marine fatty acid from the sponge *Polymastia penicillus*. **Chemical Physiology Lipids**, v.161, n.1, p.38-43, 2009.

CARNEIRO, M. B.; LOPES, M. E.; VAZ, L. G.; SOUSA, L. M.; DOS SANTOS, L. M.; DE SOUZA, C. C.; et al. IFN-gamma-Dependent Recruitment of CD4(+) T Cells and Macrophages Contributes to Pathogenesis During *Leishmania amazonensis* Infection. **Journal Interferon Cytokine Research**, v.35, n.12, p.935-947, 2015.

CHAI, Y.; YAN, S.; WONG, I. L. K.; CHOW, L. M. C.; SUN, H. Complexation of antimony (Sb-V) with guanosine 5'-monophosphate and guanosine 5'-diphosphate-mannose: formation of both mono- and bis-adducts. **Journal Inorganic Biochemistry**, v.99, p.2257-2263, 2005.

CHAKRAVARTY, J.; KUMAR, S.; TRIVEDI, S.; RAI, V. K.; SINGH, A.; ASHMAN, J. A.; LAUGHLIN, E. M.; KAHN, S. T.; BECKMAN, A. M.; COWGILL, K. D.; REED,

S. G.; SUNDAR, S.; PIAZZA, F. M. A clinical trial to evaluate the safety and immunogenicity of the LEISH-F1 + MPL-SE vaccine for use in the prevention of visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v.29, p.3531-3527, 2011.

CHAMPOUX, J. J. DNA topoisomerase: structure, function and mechanism. **Annuals Reviews Biochemistry**, v.70, p.369-413, 2001.

CHAWLA, B.; MADHUBALA. Drugs targets in *Leishmania*. **Journal Paarasitology Diseases**, v.34, n.1, p.1-13, 2010.

CHEN, M.; CHISTENSEN, B. S.; BLOM, J.; LEMMNICH, E.; FICH, K.; THEANDER, T. G.; KHARAZMI, A. Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of *Leishmania*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.37, p. 2550-2556, 1993.

CHENN, M.; ZHAI, L.; CHRISTENSEN, S. B.; THEANDER, T. G.; KHARAZMI, A. Inhibition of fumanate reductase in *Leishmania major* and *L. donovani* by chalcones. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.45, n.7, p.2023-2029, 2001.

CHOWDHURY. A. R.; MANDAL, S.; GOSWAMI, A.; GHOSH, M.; MANDAL, L.; CHAKRABORTY, D.; GANGULY, A. TRIPATHI, G.; MUKHOPADHYAY, S.; BANDYOPADHYAY, S.; MAJUMDER, H. K. Dihydrobetulinic acid induces apoptosis in *Leishmania donovani* by targeting DNA topoisomerase I and II: implications in antileishmanicidal therapy. **Molecular Medicine**, v.9, p.26-36, 2003.

CHUDZIK, D. M.; MICHAELS, P. A.; HOWG, G. Structure of type 2 peroxisomal targeting signals in two trypanosomatid aldolases. **Journal Molecular Biology**, v.300, n.2, p.697-707, 2000.

COELHO-JUNIOR, L. G.; RODRIGUES, L. C. B.; MECHADO, G. B.; FIGUEIREDO, E. T.; REIS, F. T. M.; MONTEIRO, M. L. G. R.; FAVALI, C. B. F.; LIMA, D. Co-infecção por leishmaniose visceral e vírus da imunodeficiência humana: uma evolução clínica desfavorável. **Journal of Tropical Pathology**, v.45, n.2, p.233-240, 2016. doi: 10.5216/rpt.45i2.42014.

COLER, R. N.; REED, S. G. Second-generation vaccines against leishmaniasis. **Trends Parasitology**, v.21, n.5, p.244-249, 2005.

COOK, G. C. Some early British contributions to tropical disease. **Journal of Infection**, v. 27, n.3, p. 325-333, 1993.

COX, F. E. History of human parasitology. **Clinical Microbiologu Reviews**, v.15, n.4, p.594-612, 2002.

CRETAIO, E.; PATTARELLO, L.; FONTEBASSO, Y.; BENEDITTI, P.; LOSASSO, C. Human DNA topoisomerase IB: sctstructure and functions. **Journal Biochemistry**, v.56, p.91-102, 2007.

CROFT, S. L., NEAL, R. A., PENDERGAST, W., CHAN, J. H. The activity of alkyl phosphorylcholines and related derivatives against *Leishmania donovani*. **Biochemical Pharmacology**, v.36, n.16, p.2633-2636, 1987.

CROFT, S. L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy-challenges and opportunities. **Clinical Microbiology and Infection**, v.17, n.10, p.1478-1483, 2011.

DANESHVAR, H.; MOLAEI, M.M.; AFSHAR, R.M.; KAMIABI, H.; BURCHMORE, R.; HAGAN, P.; PHILLIPS, R.S. Gentamicin-attenuated *Leishmania infantum*: A clinicopathological study in dogs. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.129, p.28-35, 2009.

DANESHVAR, H.; MOLAEI, M.M.; KAMIABI, H.; BURCHMORE, R.; HAGAN, P.; STEPHEN PHILLIPS, R. Gentamicin-attenuated *Leishmania infantum*: cellular immunity production and protection of dogs against experimental canine leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v.32, p.722-730, 2010.

DANIELLI, M. G. M.; SOARES, D. C.; ABREU, H. S.; PEÇANHA, L. M. T.; SARAIVA, E. M. Leishmanicidal effect of LLD-3 (1), a nor-triterpene isolated from *Lophanthera lactescens*. **Phytochemistry**, v.70, n.5, p.608-614, 2009. doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.03.009.

DAS, A.; DASGUPTA, A.; SENGUPTA, T.; MAJUMDER, H. K. Topoisomerases of kinetoplastid parasites as potential chemotherapeutic targets. **Trends in Parasitology**, v.20, n.8, p.381-387, 2004a.

DAS, B. B.; GANGULY, A.; MAJUMDER, H. K. DNA topoisomerase of leishmania: the potential targets for anti-leishmanial therapy. **Advance Experimental Medicine Biology**, v.625, p.103-115, 2008.

DAS, B. B.; GANGULY, A.; MAJUMDER, K. DNA topoisomerase of *Leishmania*: the potential targets for anti-leishmanial therapy. In: MAJUMDER (Org). **Drug Targets in Kinetoplastide Parasites**. Landes BioScience, 2007, p.1-13.

DAS, B. B.; SEN, N.; DASGUPTA, S. B.; GANGULY, A.; DAS, R.; MAJUMDER, H. K. Topoisomerase research of kinetoplastid parasite *Leishmania* with special reference to development of therapeutics. **Indian Journal Medicinal Research**, v.123, p.221-223, 2006b.

DAS, B. B.; SEN, N.; GANGULY, A. MAJUMDER, H. K. Reconstitution of functional characterization of the usual bi-subunit type I DNA topoisomerase from *Leishmania donovani*. **FEBS Letters**, v.565, p.81-88, 2004b.

DAS, B. SENGUPTA, T.; GANGULY, A.; MAJUMDER, H. K. Topoisomerases of kinetoplastid parasites: why so fascinating? **Molecular Microbiology**, v.62, p.917-927, 2006b.

DECUYPERE, S.; VANAERSCHOT, M.; YARDLEY, V.; MAES, L.; DONCKER, S.; CHAPPUIS, F.; DUJARDIN, J.C. Molecular mechanisms of drug resistance in

natural *Leishmania* populations vary with genetic background. **Neglected tropical diseases**, v.6, n. 2, p. 01-16, 2012.

DEXHEIMER, T. S.; POMMIER, Y. DNA cleavage assay for the identification of topoisomerase I inhibitors. **Nature Protocols**, v. 3, n.11, p.1736-1750, 2008.

DHARN, D, N. **The Chemistry of chalcones and related compounds**. Wiley: Nova York, 1981, p.213.

DIAS, F. O. P.; LOROSA, E. S.; REBELO, J. M. M. Fonte alimentar sanguínea e a peridomiciliação de *Lutzomya longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) (Psychodidae, Phebolominae). **Cadernos de Saúde Pública**, v.19, n.5, 0.1373-1380, 2003.

DÍAZ-GONZÁLES, R.; PÉREZ-PERTEJO, Y.; POMMIER, Y.; BALAÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R. M. Mutational study on the “catalytic tetrad” of DNA topoisomerase IB from hemoflagellate *Leishmania donovani*: Role os Asp-353 and Asn-221 in camptothecin resistance. **Biochemistry Pharmacology**, v.76, p.608-619, 2008. doi:10.1016/j.bcp.2008.06.019.

DIMMNOCK, J. R.; ELIAS, D. W.; BEAZELLY, M. A.; KANDEPU, N. Bioactivities of chalcones. **Current Medicinal Chemistry**, v.6, p.1125-1128, 1999.

DNENESSA, I.; CATELLI, S.; DESIDERI, A. Topoisomerase IB as a target against leishmaniasis. **Mini Reviews in Medicinal Chemistry**, v.15, n.3, p.203-210, 2015.

DOS SANTOS, A. F.; FONSECA, S. A.; César, F. A.; Santana, J. V.; Albuquerque, M. C. P.; SANT'ANA, A. E. A penta-substituted pyridine alkaloid from the rhizome of *Jatropha elliptica* (Pohl) Muell. Arg. is active against *Schistosoma mansoni* and *Biomphalaria glabrata*. **Parasitology Research**, v. 113, p. 1077-1084, 2014.

DO SOCORRO. S.; ROSAMDO, S.; MENDONÇA-FILHO, R. R.; BIZZO, H. R.; ALMEIDA-RODRIGUES, I.; SOARES, R. M.; SOUTO-PADRÓN, T.; ALVIANO, C. S.; LOPES, A. H. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrobial Agents Chemotherapeutic**, v.47, p.1895-1901, 2003.

DOSTALOVA, A., VOLFF, P. *Leishmania* development in sand flies: parasite-vector interactions overview. **Parasites & Vectors**, v.5, n.1, p. 276-285, 2012.

DUBE, A.; SINGH, N.; SAXENA, A.; LAKSHMI, V. Antileishmanial potential of a marine sponge *Haliclona exigua* (Kirkpatrick) against experimental visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v.101, n.2, p. 317-324, 2007.

DUTCHIE, M. S.; RAMAN, V. S.; PIAZZA, F. M; REED, S. G. The development and clinical evaluation of second-generation leishmaniasis vaccines. **Vaccine**, v.30, n.2, p.134-141, 2012.

FAUCHER, B.; PIARROUX, R. Actualités sur les leishmanioses. **La Revue de Médecine Interne**, v.32, n.9, p. 544-551, 2011.

FERNANDEZ, R. J. C.; CONCEPCION, J. L.; RODRIGUES, C.; CALDERA, A.; URBINA, J. A.; SOUZA, W. In vitro activities of ER-119884 and E5700, two potent squalen synthase inhibitors against *Leishmania amazonensis* antiproliferative, biochemical, and ultrastructural effects. **Antimicrobial Agents Chemotherapeutic**, v.52, p.4098-4114, 2008.

FERREIRA, M. E.; DE ARIAS, A. R.; YALLUFF, G.; DE BILBAO, N. V.; NAKAYAMA, H.; TORRES, S.; SCHININI, A.; GUY, I.; HEINZEN, H.; FURNET, A. Antileishmanial activity of furoquinolines and cumarins from *Helietta apiculata*. **Phytomedicine**, v. 14, p.377-380, 2007.

FERREYRA, M. L. F.; RIUS, S. P.; CASATI, P. Flavonoids: biosynthesis, biological functions and biotechnology applications. **Frontiers in Plant Science**, v.3, p.1-15, 2002. doi: 10.3389/fpls.2012.00222.

FOKIALAKIS, N.; KALPOUTZAKIS, E.; TEKWANI, B. L.; SKALTSOUNIS, A. L.; DUKE, S. O. Antileishmanial activity of natural diterpenes from *Cistus* sp. and semisynthetic derivatives thereof. **Biological and Pharmaceutical Bulletin**, v.29, n.8, p.1175-1778, 2006.

FORESTIER, C. L. Imaging host-*Leishmania* interactions: significance in visceral leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v.35, n.9/10, p.256-266, 2013.

FORTERRE, P.; GARIBALDO, S.; GADELLE, D.; SERRE, M. C. Origin and evolution of DNA topoisomerase. **Biochemie**, v.89, p.427-446, 2007.

FOUROMADI, A.; EMANI, S.; SORKHI, M.; NAKHJIRI, M.; NAZARIAN, Z.; HETDARIS, F.; POURAJAB, B. F.; SHAFIRE, A. Chalcones – Based synthetic chalcones as potent antileishmanicidal agents: synthetic and biological activity. **Chemical Biology Drug Discovery**, v.75, n.2, p.590-596, 2010.

FRAGA, J.; MONTALVO, A. M.; DONCKER, S.; DUJARDIN, J.C.; AUWERA, G. Phylogeny of *Leishmania* species based on the heat-shock protein 70 gene. **Infection, Genetics and Evolution**, v.10, n.2, p.238-245, 2010.

GABRIEL, C.; McMASTER, W. R.; GIRARD, D.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania donovani* promastigotes evade the antimicrobial activity of neutrophil extracellular traps. **Journal of Immunology**, v.184, n.5, p.4319-4327 2010.

GADE, D. W. Inca and colonial settlement, coca cultivation and endemic disease in the tropical forest. **Journal of Historical Geography**, v.5, p.263-280, 1979.

GARCÍA-ESTRADA, C.; PRADA, C. F.; FERNANDEZ-RUBIO, C.; ROJO-VÁZQUEZ, F.; BALAÑA-FOUCE, R. DNA topoisomerase in apicomplexan parasites: promising targets for drug Discovery. **Proceedings of the Real Society**, v.277, p.1777-1787, 2010.

GARG, R.; GRUPTA, S. K.; TRIPATHI, P.; NAIK, S.; SUNDAR, S.; DUBE, A. Immunostimulatory cellular responses of cured *Leishmania*-infected patients and hamsters against the integral membrane proteins and non-membranous soluble

proteins of a recent clinical isolate of *Leishmania donovani*. **Clinical & Experimental Immunology**, v.140, n.1, p.149-156, 2005. doi: 10.1111/j.1365-2249.2005.02745.x.

GAUTAN, S.; KUMAR, R.; MAURYA, R.; NYLÉN, S.; ANSARI, N.; RAI, M.; SUNDAR, S.; SACKS, D. IL-10 neutralization promotes paisley clearance in splenic aspirate cells from patients with visceral leishmaniasis. **Journal Infections Diseases**, v.204, p.1134-1137, 2011.

GIL, E. S.; PAULA, J. R.; NASCIMENTO, F. R. F.; BEZERRA, J. C. B. Produtos naturais com potencial leishmanicida. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.29, n.3, p.223-230, 2008.

GILLESPIE, M., TITUS, RG. The immunomodulatory factors of blood feeding arthropod saliva. **Parasite Immunology**, v.22, p.319-331, 2000.

GONZÁLEZ, R. D.; PÉREZ-PETERJO, Y.; ORDOÑEZ, D.; BALAÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R. M. Deletion study of DNA topoisomerase IB from *Leishmania donovani*: searching for a minimal functional heterodimer. **PlosOne**, v.11, p.e1177, 2007.

GRECCO, S. S.; REIMÃO, J. Q.; TEMPENO, A. G.; SARTORELLI, P.; CUNHA, R. L.R.; ROMO, F. F.P.; FERREIRA, R. J. P.; FAVERO, D. A.; LAGO, J. H. *In vitro* antileishmanial and antitrypanosomal activities of flavonones from *Baccharis retusa* D.C. (Asteraceae). **Experimental Parasitology**, v.130, v.3, p.141-145, 2012.

GREIDER, C. W. Telomers of d-Loop – t- loop. **Cell**, v.97, p.419-422, 1999.

GUEDES, H. L. M.; PINHEIRO, O. R.; CHAVES, P. S.; SIMONE, G. S.; BERGMAN, R. B. Serine proteases of *Leishmania amazonensis* as immunomodulatory and disease aggravating components of the crude LaAg vaccine. **Vaccine**, v.28, p.5491-5496, 2010.

GUL, W.; HAMMOND, N. L.; YOUSAF, M.; PENG, J.; HOLLEY, A.; HAMANN, M. T. Chemical transformation and biological studies of marine sesquiterpene (S)-(+)-curcuphenol and its analogs. **Biochemica et Biophysica Acta**, v.1770, n.11, p.1513-1519, 2007.

HARDY, L. W.; MAUTHEWS, W.; NARE, B.; BEVERLEY, S. M. Biochemical and genetic test for inhibitors of *Leishmania* pteridine pathways. **Experimental Parasitology**, v.87, p.157-169, 1997.

HAVSTEEN, B. H. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. **Pharmacology and Therapeutics**, v.96, p. 67-202, 2002.

HAWKINS, T., MIRIGIAN, M., SELCUK YASAR, M., ROSS, J. L. Mechanics of microtubules. **Journal of Biomechanics**, v.43, n.1, p.23-30, 2010.

HOCQUEMILLER, R.; CORTES, D.; AARANGO, G. J.; MYINT, S. H.; CAVÉ, A.; ANGELO, A.; MUÑOZ, V.; FOURNET, A. Isolement et Synthèse de l'Espintanol,

Nouveau Monoterpene Antiparasitaire. **Journal Natural Products**, v.54, n.2, p.445-452, 1991.

JEAN-MORENO, V.; ROJAS, R.; GOYENECHÉ, D.; COOMBS, G. H.; WLAKER, J. *Leishmania donovani*: differential activities of classical topoisomerase inhibitors and antileishmanial parasite and host cells at the level of DNA topoisomerase I and in cytotoxicity assays. **Experimental Parasitology**, v.112, p.21-30, 2006.

JENSEN, R. E.; ENGLUND, P. T. Networks news: the replications of kinetoplast DNA. **Annual Reviews Microbiology**, v. 66, p.473-491, 2012.

KAM, T. S.; SIM, K. M.; KOYANO, T.; TOYOSHIMA, M.; HAYASHI, M.; KOMAYAMA, K. Cytotoxic and leishmanicidal activities aminoglycosteroids and aminosteroids from *Holarrhena curtisii*. **Journal of Natural Products**, v.61, n.11, p.1326-1398, 1998.

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

KAZEMI, B. Genomic organization of *Leishmania* species. **Iranian Journal Parasitology**, v.6, n.3, p.1-18, 2011.

KEMP, K. Cytokine-producing T cell subsets in human leishmaniasis. **Archiv Immunology Ther Exp (Warsz)**, v.48, p.173-176, 2000.

KILLICK-KENDRICK, R. The biology and control of phlebotomine sand flies. **Clinics in Dermatology**, v.17, n.3, p.279-289, 1999.

KILLICK-KENDRICK, R. The race to discover the insect vector of kala-azar: a great saga of tropical medicine 1903-1942. **Bulletin de la Societe de Pathologie Exotique**, v.106, n.2, p.131-137, 2013.

KROGH, B.; SHUMAN, S. Catalytic mechanism of DNA topoisomerase II β . **Molecular Cell**, v.5, p.1035-1041, 2000.

KUMAR, A.; CHOWDHURY, S. R.; SARKAR, T.; CHAKRABARTI, T.; MAJUMDER, H. K.; TARUN, J.; MUKHOPHYAY, S. A new bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from *Thalictrum folialosum* as a potential inhibitor of DNA topoisomerase II β of *Leishmania donovani*. **Fitoterapia**, v.109, p.25-30, 2016.

LAINSON, R. Espécies neotropicais de leishmania: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Revista PanAmericana de Saúde**, v.1, n.2, p.13-32, 2010.

LASKAY, T., VAN ZANDBERGEN, G., SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes as host cells and transport vehicles for intracellular pathogens: Apoptosis as infection-promoting factor. **Immunobiology**, v.213, n.3/4, p.183-191, 2008.

LIBUSOVÁ, L.; SULIMENKO, T.; SULIMENKO, V.; HOZÁK, P.; DRÁBER, P. GammaTubulin in *Leishmania*: cell cycle-dependent changes in subcellular

localization and heterogeneity of its isoforms. **Experimental Cell Research**, v.295, p. 375–386, 2004.

LIMA, V. M.; IKEDA, F. A.; ROSSI, C. N.; FEITOSA, M. M.; VASCONCELOS, R. O.; NUNES, C. M.; GOTO, H. Diminished CD4+/CD25+T cells and increased IFN-gamma levels occur in dogs vaccinated with LeishMune® in an endemic area for visceral leishmaniasis. **Veterinary Immunology and Immunopathology**, v.135, p.296-302, 2010.

LINARES, E.; GIORGIO, S.; MORTARA, R. A.; SANTO, C. X.; YAMADA, A. T.; AUGUSTO, D. Role of peroxynitrite in macrophage microbial mechanisms *in vivo* revealed by protein nitration and hydroxylation. **Free Radical Biology Medical**, V.30, n.2, p.1234-1242, 2001.

LINDAHL, T. Instability and decay of the primary structure of DNA. **Nature**, v.362, p.709-715, 1993.

LONGONI, S. S.; SANCHÉZ-MORENO, M.; LÓPEZ, J. E. R.; MARÍN, C. *Leishmania infatum*: secreted iron superoxide dismutase purification and its application to the diagnosis of canine leishmania. **Comparative Immunology, Microbiology and Infection Diseases**, v.36, n.5, p.499-506, 2013.

MANUAL. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 2. ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2007.

MARTINEZ, J. M. E. **Actividad y modo de acción leishmanicida de nuevos derivados de la podofilotoxina y quinonas**. 2015. 220f. Tese (Doctorado en Ciencia), Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de León, León, Espanha, 2015.

MASIH S.; ARORA, S. K.; VASISHTA, R. K. Efficacy of *Leishmania donovani* P1 genes as DNA vaccine in experimental visceral leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, v.129, p.55-64, 2011.

MASLOV, D. A., VOTÝPKA, J., YURCHENKO, V., LUKEŠ, J. Diversity and phylogeny of insect trypanosomatids: all that is hidden shall be revealed. **Trends in Parasitology**, v.29, n.1, p.43-52, 2013.

MCCALL, L. I., ZHANG, W. W., MATLASHEWSKI, G. Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease. **PLoS Pathogens**, v.9, n.1, p. e1003053, 2013.

MEDEIROS, A. C. R.; ROSELINO, A. M. F. Leishmaniose tegumentar americana: do histórico aos dias de hoje. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.74, p.329-336, 1999.

MELOS, J. L.; ECHEVERRIA, A. Sistemas enzimáticos de tripanossomatídeos como potencias alvos quimioterápicos. **Revista Virtual de Química**, v.4, n.4, p.374-392, 2012.

MENEZES, J. P.; GUEDES, C. E.; PETERSEN, A. L.; FRAGA, D. B.; VERAS, P. S. Advances in development of new treatment for leishmaniasis. **Biomedicine Research International**, v.2015, p.1-11, 2015. doi: 10.1155/2015/815023.

MICHELETTI, A. C.; BEATRIZ, A. Progressos recentes na pesquisa de compostos orgânicos com potencial atividade leishmanicida. **Revista Virtual de Quíica**, v.4, n.4, p.268-286, 2012.

MIRET, J.; NASCIMENTO, E.; SAMPAIO, W.; FRANÇA, J. C.; FUJIWARA, R. T. Evaluation of an immunochemotherapeutic protocol constituted of n-methyl meglumine antimoniate (Glucantime) and the recombinant Leish-110f + MPL-SE vaccine to treat canine visceral leishmaniasis. **Vaccine**, v.26, p.1585-1594, 2008.

MISSAWA, N. A.; LOROSA, E. S.; DIAS, A. S. Preferência alimentar de *Lutzomyia longipalpis* (Lutz e Neiva, 1912) (Psychodidae, Phlebotominae) em área de transmissão de leishmaniose visceral em Mato Grosso. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.41, n.4, p.365-368, 2008.

MONTECUCCO, A.; BIAMONTI, G. Pre-mRNA processing factors meet the DNA damage response. **Frontiers in Genetics**, v.4, p. 1-14, 2013. doi:10.3389/fgene.2013.00.

MONTE-NETO, R. L.; COELHO, A. C.; RAUMOND, F.; LEGARÉ, D.; CORBEIL, J.; MELO, M. N.; FREZARD, F.; OUELLETTE, M. Gene Expression Profiling and Molecular Characterization of Antimony Resistance in *Leishmania amazonensis*. **PlosOne Neglected Tropical Diseases**, v.5, n.5, p.e-1167, 2011.

MORAES, T. R.; COSTA-SILVA, T. A.; TEMPONE, A. G.; BORBOREMA, S. E. T.; SCOTTI, M. T.; SOUZA, R. M. F. Antiparasitic activity of natural and semi-synthetic tirucallane triperoids from *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae): Structure-Activity Relationships. **Molecules**, v.19, p.5761-5776, 2014.

MORI-YASUMOTO, K.; IZUMOTO, R.; FUCHINO, H.; OOI, T.; AGATSUKA, Y.; KUSUMO, T.; SATAKE, M.; SEKITA, S. Leishmanicidal activities and cytotoxicities of bisnaphthoquinone analogues and naphthol derivatives from *Burman Diospyros burmanica*. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.20, p.5215-5219, 2012.

MOTTRAN, J. C.; COOMBS, G. H.; ALEXANDER, J. Cysteine peptidases as virulence factors of *Leishmania*. **Current Opinion Microbiology**, v.7, p.375-381, 2004.

MOURI, O., MORIZOT, G., VAN DER AUWERA, G., RAVEL, C., PASSET, M., CHARTREL, N., JOLY, I., THELLIER, M., JAURÉGUIBERRY, S., CAUMES, E., MAZIER, D., MARINACH-PATRICE, C., BUFFET, P. Easy identification of *Leishmania* species by mass spectrometry. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v.8, n.6, p.e2841, 2014.

MUKHOPADHYAY, D.; DALTON, J. E.; KAYE, P. M.; CHATTERJEE, M. Post Kala-azar dermal leishmaniasis: an unresolved mystery. **Trends in Parasitology**, v.30, n.2, p.65-74, 2014. doi: [10.1016/j.pt.2013.12.004](https://doi.org/10.1016/j.pt.2013.12.004).

MURRAY, HW., TSAI, CW., LIU, J., MA, X. Visceral *Leishmania donovani* infection in interleukin-13-/-mice. **Infection and Immunity**, v.74, p.2487–2490, 2006.

NAGLE, A. S.; KHARE, S.; KUMAR, A. B.; SUPEK, F.; BUCHYNSKY, A.; MATHISON, C. J. N.; CHENNAMANENI, N. K.; PENDEM, N.; BUCKENER, F. S.; GELB, M. H.; MOLTENI, V. Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis. **Chemical Reviews**, v.114, n.22, p.11305-11347, 2014.

NAKAO, Y.; SHIROIWA, T.; MURAYAMA, S.; MATSUNAGA, S.; GOTO, Y.; MATSUMOTO, Y.; FUSEYANI, N. Identification of renieramycin A as an antileishmanial substance in a marine sponge *Neopetronia* sp. **Marine Drugs**, v.2, n.2, p.55-62, 2004. doi: 10.3390/md202055.

NAVIN, T. R., ARANA, B. A., ARANA, F. E., BERMAN, J. D., CHAJÓN, J. F. Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus Ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. **Journal of Infectious Diseases**, v.165, n.3, p.528-534, 1992.

NEAL, R. A.; CROFT, S. L.; An *in vitro* system for determining the activity of compounds against the intracellular amastigotes form of *Leishmania donovani*. **Journal Antimicrobial Chemotherapeutic**, v.14, p.463-475, 1984.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural products as sources of new drugs over the 20 year from 1981-2010. **Journal Natural Products**, v.75, n.3, p. 311-335, 2012. doi:10.1021/np2009065.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M.; SHADER, K. M. Natural Products as source of new drugs over the period 1981 – 2002. **Journal Natural Products**, v.66, p.1022-1037, 2003.

NGUEWA, P. A., FUERTES, M. A., CEPEDA, V., IBORRA, S., CARRIÓN, J., VALLADARES, B., ALONSO, C., PÉREZ, J. M. Pentamidine is an antiparasitic and apoptotic drug that selectively modifies ubiquitin. **Chemistry & Biodiversity**, v. 2, n.10, p. 1387-1400, 2005.

NITISS, J. L.; SOANS, E.; ROGOTINA, A.; SESH, A.; MISHINA, M. Topoisomerase Assays. **Current Protocol Pharmacology**, v.3, p.1-33, 2012. doi: 10.1002/10471141755./ph03033357.

PANDAYA, S.; VERMA, R. K.; KHARE, P.; TIWARI, B.; SRINAVASARAO, D. A.; DUBE, A.; GOYAL, N.; MISRA, A. Supplementation of host response by targeting nitric oxide to the macrophage cytosol is efficacious in the hamster model of visceral leishmaniasis and adds to efficacy of amphotericin B. **International Journal Parasitology Drugs Drug Resistance**, v.6, n.2, p.125-132, 2016. doi:10.1016/j.ijpddr.2016.01.001

PATIL, R. S.; PATIL, M. S.; KSHIRSAGAR, S. S.; CHAUDHARI, P. S.; BAYAS, J. P.; OSWAL, R. J. Synthetic and natural products against leishmaniasis: A review. **World Journal Health Sciences**, v.1, n.1, p. 7-22, 2012.

PAULA, C. D. R.; SAMPAIO, J. H.; CARDOSO, D. R.; SAMPAIO, R. N. R. A comparative study between the efficacy of pentamidine isothionate given in three doses for one week and N-metil glucamine in a dose of 20 mg SbV/day for 20 days to treat cutaneous leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.36, n.2, p.365-371, 2003.

PEDRIQUE, B.; STRUB-WOURGAFT, N.; SOME, C.; OLLIARO, P.; TROUILLER, P.; FORD, N.; PÉCOUL, B.; BRADOL, J. H. The drug and vaccine landscape for neglected diseases (2000–2011): a systematic assessment. **The Lancet Global Health**, v.1, n.6, p. e371-e379, 2013.

PETERS, N. C., EGEN, J. G., SECUNDINO, N., DEBRABANT, A., KIMBLIN, N., KAMHAWI, S., LAWYER, P., FAY, M. P., GERMAIN, R. N., SACKS, D. *In vivo* imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science**, v.321, n.5891, p. 970-974, 2008.

PLEWES, K. A.; BARR, S. D.; GEDAMU, L. Iron superoxide dismutase targeted to glycosomes of *Leishmania chagasi* are important for survival. **Infections and Immunity**, v.71, n.10, p. 5910-5920, 2003.

PLOURDE, M.; COELHO, A.; KEYNAZ, Y. ; LARIOS. O.E; NDAO, M.; RUEST, A.; ROY, G.; RUBINSTEIN, E.; OUELLETTE, M. Genetic polymorphisms and drug susceptibility in four isolates of *Leishmania tropica* obtained from Canadian soldiers returning from Afghanistan. **Neglected tropical diseases**. v.6, n.1, p.01-07, 2012.

POMMIER, Y. DNA topoisomerase I inhibitors: chemistry, biology and interfacial inhibition. **Chemical Reviews**, v.109, p.2894-2902, 2009.

POMMIER, Y. Topoisomerase I inhibitors: camptothecins and beyond. **Nature Reviews Cancer**, v.70, p.789-802, 2006.

POMMIER, Y.; LEO, E.; ZHANG, H.; MARCHAND, C. DNA topoisomerases and their poisoning by anticancer and antibacterial drugs. **Chemical Biology**, v.17, n.28, p.421-433, 2010. doi:10.1016/j.chembiol.2010.04.012.

PRADA, C. F. **Estudio de las regiones implicadas en la funcionalidad y resistencia a fármacos de la ADN topoisomerasa IB de *Leishmania***. 2013. 246f. Tese (Doctorado en Ciencia), Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de León, León, España, 2013a.

PRADA, C. F.; ÁLVAREZ-VELILLA, R.; BALAÑA-FOUCE, R.; PRIETO, C.; CALVO-ÁLVAREZ, E.; ESCUDERO-MARTÍNEZ, J. M.; REQUENA, J. M.; ORDOÑEZ, C.; DESIDERI, A.; PÉREZ-PERTEJO, Y.; REGUERA, R. M. Gimatecam and other camptothecin derivatives poison *Leishmania* DNA-topoisomerase IB leading to a strong leishmanicidal effect. **Biochemical Pharmacology**, v.85, p.1433-1440, 2013b.

PRADA, C. F.; ÁLVAREZ-VELILLA, R.; DÍAZ-GONZÁLEZ, R.; PÉREZ-PERTEJO, Y.; BALAÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R. M. Identification and characterization of the regions involved in the nuclear translocation of the heterocimeric Leishmanial DNA topoisomerase IB. **PlosOne**, v.8, n.9, p.e-73565, 2013c.

PRADO, P. F.; ROCHA, M. F.; SOUZA, J. F. Epidemiological aspects of human and canine visceral leishmaniasis in Montes Claros, states of Minas Gerais, Brazil between 2007 and 2009. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.44, n.5, p.561-566, 2011.

PRATT, D. M., DAVID, J. R. Monoclonal antibodies that distinguish between New World species of *Leishmania*. **Nature**, v.291, n.5816, p. 581-583, 1981.

RAKOTOMANGA, M., BLANC, S., GAUDIN, K., CHAMINADE, P., LOISEAU, P. M. Miltefosine affects lipid metabolism in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.51, n.4, p.1425-1430, 2007.

RAKOTOMANGA, M.; LOISEAU, P. M.; SAINT-PIERRE-CHAZALET, M. Hexadecylphosphocholine interaction with lipid monolayers. **Biochemistry, Biophysic Acta**, v.1661, p. 212-218, 2004.

REGUERA, R. M.; BALAÑA-FOUCE, R.; SHOWALTER, M.; HICKERSON, S.; BEVERLEY, S. M. *Leishmania major* lacking arginase (ARG) are auxotrophic for polyamines but retain infectivity to susceptible BALB/c mice. **Molecular Biochemical Parasitology**, v.165, p.48-56, 2009.

RICHAMOND, T. J.; DAVEY, C. A. The structure of DNA in the nucleosome core. **Nature**, v.423, p.145-175, 2003.

RIERA, C., FISA, R., LOPEZ-CHEJADE, P., SERRA, T., GIRONA, E., JIMENEZ, M., MUNCUNILL, J., SEDENO, M., MASCARO, M., UDINA, M., GALLEGRO, M., CARRIO, J., FORTEZA, A., PORTUS, M. Asymptomatic infection by *Leishmania infantum* in blood donors from the Balearic Islands (Spain). **Transfusion**, v.48, n.7, p. 1383-1389, 2008.

RITTER, U., FRISCHKNECHT, F., VAN ZANDBERGEN, G. Are neutrophils important host cells for *Leishmania* parasites? **Trends Parasitology**, v.25, p.505–510, 2009.

ROBERTS, L.S.; JANOVY, J. JR. **Foundations of Parasitology**. 6^a Ed. Boston: McGraw-Hill, 2000.

ROBERTS; M. F.; WINK, M. Alkaloids: introduction. In: _____. (Org). *Alkaloids, Biochemistry, Ecology and Medicinal applications*. New York: Language of Science, 1998.

SAFFARI, B.; MOHABATKAR, H. Computacional analysis of cysteine proteases (CLAN CA, Family C1) of *Leishmania major* to find potential epitopic regions. **Genomics, Proteomics and Bioinformatics**, v.3, n.2, p.14-18, 2009.

SAHA, B.; TONKAL, A. M. D. J.; CROFT, S.; ROY, S. Mast cells at the host–pathogen interface: host-protection *versus* immune evasion in leishmaniasis. **Clinical & Experimental Immunology**, v.137, n.1, p.19-23, 2004.

SAHA, S.; ACHARUA, C.; PAL, V.; CHOWDHURY, R.; SAKAR, K.; MAITI, N. C.; JAISSANKAR, P.; MAJUNDER, H. A novel Spirooxidole derivative inhibits the growth of *Leishmania donovani* parasites both *in vitro* and *in vivo* by targeting tyoe IB topoisomerase. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.60, p.6281-6293, 2016. doi:10.1125/AAC.003252-16.

SANTOS, M. S. **Avaliação do potencial leishmanicida de derivados guanilidrazônicos e tiossemicarbazônicos**. 2014. 67f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde), Instituto de Ciências Biológicas e da Saúde, Universidade Federal de Alagoas, Maceió. 2014.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Microbiology**, v.16, n.8, p.581-592, 2016.

SEMWAL, D. K.; BADONE, R.; SEMWAL, R.; KOTHIYAL, S. K.; SING, G. J. P.; RAWAT, V. The genus *Sthepania* (Menispermaceae): chemical and pharmacology perspective. *Journal of Ethnopharmacology*, v. 132, p.369-388, 2010.

SEN, N.; DAS, B. B.; GANGULY, A.; BANERJEE, B.; SEN, T.; MAJUMDER, H. K. *Leishmania donovani*: intracellular ATP level regulates apoptosis-like death in Luteolin induced dyskinetoplastid cells. **Experimental Parasitology**, v.114, n.3, p.204-214, 2006.

SEN, R.; CHATTERJEE, M. Plant derived therapeutics for the treatment of leishmaniasis. **Phytomedicine**, v.18, p.1056-1069, 2011.

SENGUPTA T.; MUKHERJEE, M.; DAS, A.; MANDAL, C.; DAS, R.; MUKHERJEE, T.; MAJUMDER, H. K. Characterization of the ATPase activity of topoisomerase II from *Leishmania donovani* and identification of residues conferring mesistanceto etoposide. **Biochemistry Try Journal**, v.390, p.419-426, 2006. doi:10.1042/BJ20042128.

SHARMA, G.; CHOWDHURY, S. R.; SINHA, S.; MAJUMDER, H. K.; KUMAR, A. Antileishmanial activity evaluation of bis-lawsone analogs and DNA topoisomerase-I inhibition studies. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v.29, n.2, p.185-189, 2014. doi:10.3109/14756366.2013.765413.

SIESAREV, A. I.; STETTER, K. O.; LAKE, J. A.; GELLERT, M.; KRAH, R.; KOZYAVKIN, S. A. DNA topoisomerase V is a relative of eukaryotic topoisomerase I from a hyperthermophilic prokaryote. **Nature**, v.364, p.735-737, 1993.

SILVA, E. A.; ANDREOTTI, R.; HONER, M. R. Comportamento de *Lutzomyia longipalpis* vetor principal da leishmaniose visceral americana em Campo

Grande, estado do Mato Grosso do Sul. **Revista Brasileira de Medicina Tropical**, v.40, n.4, p.420-424, 2007.

SILVIA-LÓPEZ, R. E. Preoteases de Leishmania: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**, v.33, p.1541-1548, 2010.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. K. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, p.485-497, 2012.

SINAM, Sistema de Informação de Agravos de Notificação. Tabulação de dados. Disponível em: <http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/>, acesso em 20 de Setembro de 2014.

SLESAREVE, A. I.; STETTER, K. O.; LAKE, J. A.; GELLET, M.; KRAH, R.; KOZYAVKIN, S. A. DNA topoisomerase V is a relative of eukaryotic topoisomerase I from a hyperthermophilic prokaryote. **Nature**, v.364, p.735-737, 1993.

SOARES, MB., TITUS, RG., SHOEMAKER, CB., DAVID, JR., BOZZA, M. The vasoactive peptide maxadilan from sand fly saliva inhibits TNF-alpha and induces IL-6 by mouse macrophages through interaction with the pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide (PACAP) receptor. **Journal of Immunology**, v.160, p.1811-1816, 1998.

SOLOMÓN, O. D.; FELICIANGELI, M. D.; QUINTANA, M. G.; AFONSO, M. M. S.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* urbanization and control. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.110, n.7, 0.831-846, 2015.

SOUSA, J. M.; LAREAU, S.; PEARSON, R. D.; CARVALHO, E. M.; MANN, B. J.; JERONIMO, S. M. B. Characterization of *Leishmania chagasi* DNA topoisomerase II: a potential chemotherapeutic target. **Scandinavian Journal Infection Diseases**, v.35, p.826-829, 2003.

STERKERS, Y., LACHAUD, L., BOURGEOIS, N., CROBU, L., BASTIEN, P., PAGÈS, M. Novel insights into genome plasticity in Eukaryotes: mosaic aneuploidy in *Leishmania*. **Molecular Microbiology**, v.86, n.1, p.15-23, 2012.

SUNDAR, S., JHA, T. K., THAKUR, C. P., SINHA, P. K., BHATTACHARYA, S. K. Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India. **The New England Journal of Medicine**, v.356, n.25, p.2571-2581, 2007.

TAKANA, J. C. A.; SILVA, C. C.; FERREIRA, F. C. P.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; OLIVEIRA, A. J. B. Antileishmanial activity of índole alkaloids from *Aspidosperma ramiflorum*. **Phytochemistry**, v.14, p.377-380, 2007.

TAN, N.; KALOGA, M.; RADTKE, O. A.; KIDERLEN, A. F.; OKSUZ, S.; ULUBELEN, A.; KOLODZIEJ, H. Abietane diterpenoids and triterpenoic acids from *Salvia cilicica* and their antileishmanial activities. **Phytochemistry**, v.61, n.8, p.881-884, 2002.

TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M.; CREPALDI, P. H.; SOUZA, W. **Atlas didático: Ciclos de vida da Leishmania**, 1ª edição, Rio de Janeiro, 2013.

TEJERÍA, A.; PÉREZ-PERTEJO, Y.; REGUERA, R. M.; BALAÑA-FOUCE, R.; ALONSO, C.; FUERTES, M.; GONZÁLEZ, M.; RUBIALES, G.; PALACIOS, F. Antileishmanial effects of new indedo-1,5-naphthyridines, selective inhibitors of *Leishmania infatum* type IB DNA topoisomerase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.124, p.740-749, 2016.

TELES, Y. C. F.; CHAVES, D. S.; AGRA, M. F.; BASTISTA, L. M.; WUEIROS, A. C.; ARAUJO, M. V.; MOREIRA-ALEXANDRE, M. S.; BRAZ-FILHO, R.; SOUZA, M. F. V. Chemical constituents from *Sidastrum paniculatum* and evaluation of their leishmanicidal activity. **Brazilian Journal of Pharmacology**, v.25, n.2, p.363-368, 2015.

THOLL, D. Biosynthesis and Biological functions of terpenoids in plants. In: Scharader, J.; Bohlmann, J. *Biotechnology of Isoprenoids*. Springer, 2015.
THOMSON, R. H. **Naturally occurring quinones**. Academic Press: New York, 1971, 302p.

THOMSON, R.H. 1971. Naturally occurring quinones. 2nd Ed., Academic ,,

TOLEDO, J. S.; VASCONCELOS, E. J. R.; FERREIRA, T. R.; CRUZ, A. K. Using genomic information to understand *Leishmania* biology. **The Open Parasitology Journal**, v.4, p.156-166, 2010.

TOUN, F. F.; AMATO, V. S.; GRAF, M. E.; SIQUEIRA, A. M.; NICODEMO, A. C.; AMATO NETO, V. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis--a systematic review with a meta-analysis. **International Journal Dermatology**, v.47, n.2, p.109-124, 2008. doi: 10.1111/j.1365-4632.2008.03417.x.

TRAVERS, A.; MUSKHELISHVILI, G. A common topology for bacterial and eukaryotic transcription initiation? **EMBO Reports**, v.8, n.2, p.11-200, 2007.

TURABEKOVA, M. A.; VINOGRADORA, V. I.; WERBOVETZ, K. A.; CAPERS, J.; RASULEV, B. F.; LEVKOVICH, M. G.; RAKHIMOV, S. B.; ABDULLAEV, N. D. structure-activity relationship investigations of leishmanicidal N-benzylcytosine derivatives. **Chemical Biology Drug Design Journal**, v.78, n.1, p.183-189, 2011.

TURCO, S. J., SACKS, D. L. Expression of a stage-specific lipophosphoglycan in *Leishmania major* amastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v.45, n.1, p.91-99, 1991.

USTA, J.; KREYDIYYEH, S.; KNIO, K.; BARNABE, P.; BOU-MOUGHLABAY, Y.; DAGHER, S. Linalool decreases HepG2 viability by inhibiting mitochondrial complexes I and II, increasing reactive oxygen species and decreasing ATP and GSH levels. **Chemico-Biological Interactions**, v.180, n.1, p.39-46, 2009.

VAN GRIENSVEN, J., BALASEGARAM, M., MEHEUS, F., ALVAR, J., LYNEN, L., BOELAERT, M. Combination therapy for visceral leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v.10, n.3, p.184-194, 2010.

VASSALO, O.; CASTELLI, S.; BINAS, A.; SENGUOTA, S.; DAS, P. K.; ANNESSA, I. D.; OTERI, F.; LEONI, A.; TAGLIATESTA, P.; MAJUNDER, H. K.; DESIDERI, A. Conjugated eicosapentaenoic acid (cEPA) inhibitors *Leishmania donovani* topoisomerase I and has an antiproliferative activity against *L. donovani* promastigotes. **The Open Antimicrobial Agents Journal**, v.3, p.23-29, 2011.

VERMA, N. K., SINGH, G., DEY, C. S. Miltefosine induces apoptosis in arsenite-resistant *Leishmania donovani* promastigotes through mitochondrial dysfunction. **Experimental Parasitology**. V.116, n.1, p.1-13, 2007.

VIARD, T.; TOUR, C. B. Type IA topoisomerases: A simple puzzle? **Biochimie**, v.89, p.456-467, 2007.

VILLA, H.; MARCOS, A. R. O.; REGUERA, R. M.; BALAÑA-FOUCE, R.; GARCÍA-ESTRADA, C.; PÉREZ-PERTEJOI, Y.; TEKNANI, B. L.; MYLER, P. J.; STUART, R. D.; BJORNSTI, M. A.; ORDOÑEZ, D. A novel active DNA topoisomerase I in *Leishmania donovani*. **The Journal of Biological Chemistry**, v.278, n.6, p.3521-3526, 2003.

VILLAESCUSA-CASTILLO, L.; DÍAZ-LANZA, A. M.; DELMAS, G. F.; OLLIVIER, E.; BARNABÉ, M.; FAURE, R.; ELIAS, R.; BALANSARD, G. Antiprotozoal Activity of Sesquiterpenes from *Jasonia glutinosa*. **Pharmaceutical Biology**, v.38, n.3, p.176-180, 2000. doi:10.1076/1388-0209(200007)3831.

VINOGRAD, L. J.; RADLOFF, R.; WATSON, R.; LAIPSIS, P. The twisted circular form of polyoma viral DNA. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.53, p.1004-1111, 1965.

VOLOGODSKII, A. V.; COZZRELLI, N. R. Conformational and thermodynamic properties of supercoiled DNA. **Annuals Reviews Biophysic, Biomolecular Structural**, v.23, p.609-643, 1994.

WANG, J. C. Cellular roles of DNA topoisomerase: a molecular perspective. **Nature Reviews Molecular Cellular Biology**, v.3, p.430-440, 2002.

WERBOVERTZ, K. A. Target-based drug discovery for malaria, leishmaniasis and trypanosomiasis. **Current Medicinal Chemistry**, v.7, p.835-860, 2000.

WHEAT, WH., PAUKEN, KE., MORRIS, RV., TITUS, RG. *Lutzomyia longipalpis* salivary peptide maxadilan alters murine dendritic cell expression of CD80/86, CCR7, and cytokine secretion and reprograms dendritic cell mediated cytokine release from cultures containing allogeneic T cells. **Journal of Immunology**, v.180 p.8286-8298, 2008.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. WHO;

2016. (Acesso em outubro de 2016). Disponível em <http://www.who.int/leishmaniasis/resources/en/>

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis. Geneva, Switzerland: WHO; 2015. (Acesso em Junho de 2016). Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Leishmaniasis. Geneva, Switzerland: WHO; 2013. (Acesso em Maio de 2016). Disponível em: <http://www.who.int/leishmaniasis/en>.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO) **Control of leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis**. World Health Organization, Geneva, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). Guidelines on good agricultural and collection practices (GACP) for medicinal plants. Geneva: WHO, 2003.

YOUNG, D. C. **Computational chemistry : a practical guide for applying techniques to real world problems**. New York, J. Wiley, 1984.

ZAK, D. E.; ADEREM, A. Systems biology of innate immunity. **Immunology Reviews**, v.227, n.1, p.264-282, 2009. doi: 10.1111/j.1600-065X.2008.00721.x.

ZHAI, L.; CHEN, J.; THEA DER, T. E.; CHRISTENSEN, S. B.; KHARAZMI, a. Their antileishmanicidal activity of novel oxygenated chalcones and their mechanism of action. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, v.43, p.793-803, 1999.

ZHANG, W. W.; MIRANDA-VERSATEGUI, C.; AREVALO, J.; NADAO, M.; WARD, B.; LLANOS-CUENTAS.; MATLASHEWSKI, G. Development of a genetic assay to distinguish between *Leishmania viana* species on the basis of isoenzyme differences. **Clinical Infectious Diseases**, v.42, n.15, p.801-809, 2006.

ZHOU, Y., MESSIER, N., OUELLETTE, M., ROSEN, B. P., MUKHOPADHYAY, R. *Leishmania major* LmACR2 is a pentavalent antimony reductase that confers sensitivity to the drug pentostam. **The Journal of Biological Chemistry**, v.279, n.36, p.37445-37451, 2004.

GERAL

Avaliar o efeito leishmanicida de substâncias naturais e semissintéticas via inibição seletiva da atividade enzimática de DNA topoisomerase IB de *Leishmania* sp.

ESPECÍFICOS

- Analisar o perfil químico da fração acetato de etila, por CCDA e UPLC-DAD-q-TOF-MS, da própolis coletada na cidade de Casa Nova, Bahia.
- Avaliar a citotoxicidade do extrato etanólico, frações hexano, acetato de etila e metanol-água da própolis coletada na Bahia, e dos flavonoides naringenina e isoramnetina, frente a macrófagos da linhagem J774, em ensaios *in vitro*.
- Avaliar o efeito leishmanicida do extrato etanólico, frações hexano, acetato de etila e metanol-água da própolis coletada na Bahia, e dos flavonoides naringenina e isoramnetina, sobre formas promastigotas e amastigotas das espécies *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*, em ensaios *in vitro*.
- Investigação a ação dos flavonoides naringenina e isoramnetina sobre a atividade da enzima DNA topoisomerase IB presente no extrato enzimático obtido de *L. chagasi* e DNA topoisomerase IB recombinante humana, em ensaios *in vitro*.
- Avaliar a citotoxicidade alcaloides naturais, sintéticos e modificados frente a macrófagos da linhagem J774, em ensaios *in vitro*.
- Avaliar o efeito leishmanicida de alcaloides naturais, sintéticos e modificados, sobre formas promastigotas e amastigotas das espécies *Leishmania amazonensis* e *Leishmania chagasi*, em ensaios *in vitro*.
- Avaliar o efeito leishmanicida de alcaloides naturais, sintéticos e modificados, sobre formas promastigotas e amastigotas das espécies *Leishmania infantum* iFR70, em ensaios *in vitro* e *ex vivo*, respectivamente.

- Investição a ação de alcaloides naturais, sintéticos e modificados, sobre a atividade da enzima DNA topoisomerase IB recombinante de *Leishmania* sp. e DNA topoisomerase IB recombinante humana, em ensaios *in vitro*.
- Investigar a formação de complexos de clivagem por alcaloides naturais, sintéticos e modificados, com significativa ação inibitória sobre a atividade da DNA topoisomerase IB recombinante de *Leishmania* sp.

Composição química e atividade leishmanicida *in vitro* da própolis coletada na região semiárida da Bahia, Brasil.

1. Introdução

A própolis é um material quimicamente complexo produzido por abelhas da espécie *Apis mellífera*, contendo principalmente cera e resinas coletadas de diferentes partes e secreções da planta (PETELINC et al., 2013). De modo geral, sua composição é modificada pela adição de secreções salivares oriundas das abelhas e está diretamente relacionada com a ecologia e flora de cada região visitada pelo inseto (POPOVA et al., 2010; SILVA, et al., 2014). Seus constituintes mais comuns são os polifenóis (flavonoides, ácidos fenólicos e seus ésteres), entretanto a constituição química da própolis varia de acordo com a localização geográfica, e isso influencia diretamente na mistura complexa de seus compostos bioativos e nas diversas propriedades biológicas (TORETI et al., 2013; SFORCIN, 2016).

As atividades imunomoduladora (ZAMIMI et al., 2007), antitumoral (BUFALO et al., 2009), anti-inflamatória e cicatrizante (ORSATI et al., 2010; OLCZYK et al., 2012), antioxidante, antimicrobiana e antifúngica (SFORCIN et al., 2011) e antiparasitárias (FREITAS et al., 2006; DANTAS et al., 2006; DURAN et al., 2008), são registradas para a própolis.

Estudos com a utilização de amostras de própolis coletadas em diferentes regiões do Brasil, realizados com o objetivo de investigar o efeito de seus constituintes contra *Leishmania* sp., vêm apresentando resultados promissores para o tratamento da doença (CUNHA et al., 2011). Pontin et al. (2008), investigou a atividade leishmanicida *in vitro* da própolis verde, coletada na região sudeste, e observou atividade frente a formas promastigotas de *L. amazonensis* com registros de 79,3% de inibição do crescimento. Extratos da própolis oriunda do Paraná foram testados *in vivo*, usando camundongo Balb/c infectados com *L. amazonensis*, e foi observado diminuição no número de formas amastigotas (AYRES et al., 2007).

Atualmente, não existe uma vacina humana disponível, e a quimioterapia é o principal recurso para o tratamento das leishmanioses, entretanto, está longe de ser satisfatória, devido ao longo período de tratamento, efeitos colaterais e o surgimento de resistência aos fármacos disponíveis (WONG et al., 2014; QUEIROZ et al., 2014; NAGLE et al., 2014). Diversas substâncias estão sendo testadas como quimioterápicos leishmanicidas, sendo que as principais estão

direcionadas para a inibição de vias metabólicas vitais e específicas do parasita. Dentre as vias metabólicas da leishmania, as enzimas DNA topoisomerases de leishmania e seus genes e proteínas têm despertado interesse como alvo quimioterápico, pelo fato de suas atividades enzimáticas estarem envolvidas na replicação do DNA do cinetoplasto (kDNA), bem como o fato destas enzimas apresentarem uma diferença estrutural e genética da enzima homóloga em humanos (BALAÑA-FOUCE et al., 2014).

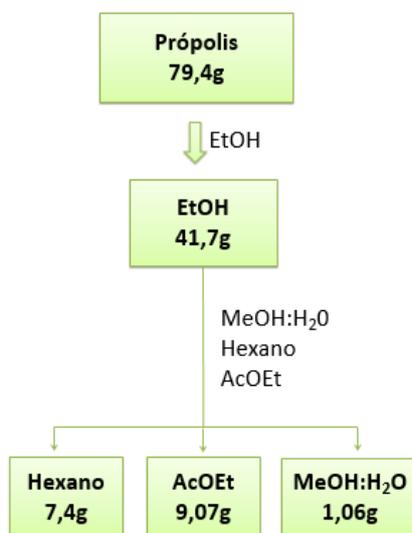
Nos últimos anos a OMS tem incentivado as pesquisas com produtos naturais para o tratamento da doença, incluindo a busca por alvos quimioterápicos, devido ao potencial destes produtos como fontes de novos e seletivos agentes para o seu tratamento, por conta da diversidade química apresentada por estes (PATIL et al., 2012; CHOUHAN et al., 2014; SINGH et al., 2014; FALCÃO et al, 2013).

Neste contexto o presente trabalho teve como objetivo realizar o estudo químico da própolis coletada na Bahia e investigar os efeitos leishmanicidas do extrato etanólico, frações orgânicas e flavonoides naringenina e isoramnetina sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*, bem como investigar as suas ações sobre a atividade das enzimas topoisomerase IB, presente nos extratos enzimáticos oriundos de *L. chagasi* (LcTopIB) e topoisomerase humana (hTopIB)

2. Materiais e métodos

2.1. Amostras de própolis e fracionamento

Para a realização do trabalho, amostras de própolis foram coletadas na cidade de Casa Nova, Bahia, em uma área de Caatinga. A obtenção do extrato etanólico (EEtOH), das frações hexano (FrHex), acetato de etila (FrAcEOt) e metanol-água (FrMeOH), está apresentada no esquema 1. Os flavonoides naringenina e isoramnetina, oriundos de um banco de flavonoides extraídos de produtos apícolas pertencente os Laboratório de Bioprospecção Fitoquímica (LaBioFito), coordenado pelo profa. Tania Sarmento, também foram utilizados nos ensaios biológicos.



Esquema 1 – Extração e partição da própolis

A fração AcOEt, foi submetida à análise por cromatografia em camada delgada analítica (CCDA), e em seguida, esta fração foi submetida à análise por espectrometria de massas de alta resolução acoplado ao sistema ACQUITY (Waters, Milford, MA, EUA). A análise foi realizada por eletrospray modo negativo (ESI-).

2.2. Análises por UHPLC-PDA-qTOF-MS/MS

A análise da fração AcOEt foi realizada utilizando um cromatógrafo líquido de ultra eficiência ACQUITY UPLC H-Class (Waters Corporation, Milford, MA, EUA), acoplado a um espectrômetro de massas Quadupolo-Tof (Xevo G2-XS QToF, Waters, EUA) com ionização por eletrospray (ESI). As separações cromatográficas foram realizadas utilizando uma coluna ACQUITY UPLCTM BEH C18 (2,1 x 50 mm, 1,7 μ m, Waters, EUA) a 40 °C. A fase móvel binária consistiu de água 0,1% de ácido fórmico (fase móvel A) e acetonitrila 0,1% de ácido fórmico (fase móvel B). O fluxo foi de 0,4 mL/min e o volume de injeção foi de 5,0 μ L. O gradiente de eluição utilizado foi: 0,0 a 8,0 min 10% - 50% de B; 8,0 a 9,0 min - 50% -95% de B e em 9,1 min 10% de B, o monitoramento foi feito a 340 nm. O espectrômetro de massas foi operado em modo negativo de ionização (ESI-) no modo sensibilidade. A detecção foi implementada no modo centróide MS^E em uma faixa de massa de 50-1200 Da. Todas as análises foram realizadas utilizando o lockspray para garantir a precisão e reprodutibilidade dos valores de massas. Leucina-encefalina (5 ng ml⁻¹) foi utilizado como padrão/referência para calibração. A aquisição e análise dos dados foi realizada utilizando o software Waters MassLynx 4.1

2.3. Ensaios biológicos e moleculares

Os ensaios *in vitro* de citotoxicidade em macrófagos J744 e de atividade leishmanicida em *L. amazonensis* e *L. chagasi* bem como os ensaios com extratos enzimático com TopIB de *L. chagasi* (LcTopIB) e topoisomerase humana recombinante (hTopIB), foram realizados no Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), sob a orientação da Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira.

2.3.1. Manutenção dos macrófagos

Para a realização dos ensaios de citotoxicidade foram utilizados macrófagos da linhagem J774, obtidos junto ao banco de células da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), estes foram mantidos em

garrafas de cultura contendo 10 mL de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®) suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 2 mM de *L*-glutamina, aminoácidos não essenciais e piruvato. Quando selecionadas para os ensaios de viabilidade, as células foram contadas em câmara de Neubauer, para obter a concentração desejada, e posteriormente semeadas em placas.

2.3.2. Cultura dos parasitos

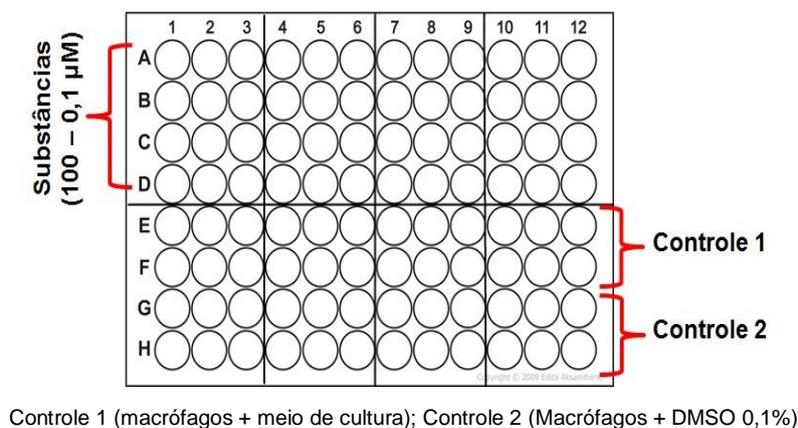
Para os ensaios de atividade leishmanicida foram utilizadas formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* (MCAN/BR/89/BA262), gentilmente cedidas pela Dra. Valéria de Matos Borges do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – Fiocruz-BA. As formas promastigotas foram mantidos *in vitro* em meio Schneider's (Sigma-Aldrich®), suplementado com 10% de SFB e 2% urina humana masculina a 27 °C em estufa de Demanda Bioquímica de Oxigênio (B.O.D). Quando selecionados para uso, os parasitos foram colocados em tubos tipo Falcon e centrifugados a 3500 *rpm* durante 10 minutos, em seguida o *pellet* foi ressuspensionado em meio Schneider's. Para determinar a concentração de parasitos a serem utilizados nos ensaios de atividade leishmanicida, o *pellet* ressuspensionado foi transferido para câmara de Neubauer e realizada a contagem de parasitos para posterior plaqueamento.

2.3.3. Ensaio de determinação da viabilidade celular em macrófago

A viabilidade celular de macrófagos frente a EEtOH, FrHex, FrAcEOt, FeMeOH e os flavonoides naringenina e isoramnetina, foi realizada através do ensaio de redução de MTT (Brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio), conforme a metodologia descrita por Hussain et al. (1993). Macrófagos da linhagem J744 foram semeados em placas de 96 poços contendo meio RPMI, numa concentração de 1×10^5 macrófagos por poço, e mantidos em repouso por 1 hora. Transcorridos este período, os macrófagos foram expostos a diferentes concentrações das substâncias (0,1; 1; 10; 100 e μM) diluídas em meio RPMI, e incubados em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por um período de 48 horas. Como controles, macrófagos foram cultivados em poços contendo apenas meio de cultura e em poços contendo

apenas o diluente do extrato da própolis (Dimetilsulfóxido 0,1% [DMSO 0,1%]) (Figura 27).

Figura 27– Distribuição de EEtOH, FrHex, FrAcEOt, FrMeOH, naringenina e isoramnetina da própolis e das substâncias controles, em placas de 96 poços para realização do ensaio de viabilidade celular em Macrófagos.



Após as 48 horas de incubação, o sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionado 100 µL da solução de MTT (5 mg/10 mL). As placas foram novamente incubadas por 1 hora sob as mesmas condições da incubação anterior, e em seguida o sobrenadante foi descartado e adicionado 100 µL de DMSO 0,1%. A leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro a 550 nm. A viabilidade celular das culturas de macrófagos tratadas com o extrato, frações e flavonoides foram comparadas ao padrão de morte obtido nas culturas controle. Para calcular a Concentração inibitória de 50% das células (CI₅₀), foi utilizada a fórmula: **Resposta = 100 + (-100) / 1+10^(X-LogCI₅₀)**.

2.3.4. Ensaio de atividade leishmanicida sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*

Os efeitos de EEtOH, FrHex, FrAcEOt, FeMeOH e os flavonoides naringenina e isoramnetina frente a formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* foi avaliado pelo ensaio de redução de MTT, conforme a metodologia de Moraes et al. (2014). Formas promastigotas foram cultivadas em placas de 96 poços contendo meio RPMI suplementado com 10% SBF, 2 mM de L-

glutamina e 2% de urina humana, na concentração de 1×10^5 células por poço. Diferentes concentrações de 0,1; 1; 10 e 100 μM , do extrato, das frações, dos flavonoides e do fármaco padrão (Pentamidina) foram adicionados aos poços até o volume final de 200 μL . Para controle de crescimento basal foram usados meio de cultura livre de extrato, frações e flavonoides, e meio de cultura contendo o solvente utilizado na solubilização (DMSO 0,1%). As placas foram incubadas em estufa B.O.D a 27 °C por 48 horas. Após o período de incubação, o sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionado 20 μL de solução de MTT (2 mg/mL). As placas foram incubadas por 2 horas em estufa a 37 °C e a 5% de CO_2 . Transcorrido o período de incubação, após o descarte do sobrenadante, foi adicionado 120 μL de Isopropanol. As placas foram mantidas em repouso por 1 hora em temperatura ambiente. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 550 nm. Os ensaios foram realizados em triplicatas e os dados obtidos foram expressos como a média \pm desvio ($X \pm \text{DP}$).

2.3.5. Ensaio de atividade leishmanicida sobre formas amastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*

Para a obtenção de formas amastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*, macrófagos da linhagem J774 foram plaqueados, na proporção de 3×10^5 células por poço, em placas de 24 poços com lamínulas e com meio RPMI suplementado e incubados em B.O.D a 27 °C. Em ensaios independentes, os macrófagos foram infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* ou *L. chagasi*, numa proporção de 10 parasitos/1 macrófago.

As placas contendo macrófagos e formas promastigotas de *L. amazonensis* foram incubadas por 1 hora em estufa a 37 °C com 5% de CO_2 ; enquanto as placas contendo macrófagos e formas promastigotas de *L. chagasi* foram incubadas por 6 horas sob as mesmas condições. Transcorrido os referidos intervalos de tempo, os macrófagos foram “lavados” com tampão fosfato-salino (PBS, pH 7,2), para remoção dos parasitos não interiorizados; em seguida, foram cultivados em meio RPMI suplementado com 10% SBF, 2 mM de L-glutamina, 2 mM de aminoácidos não essenciais e 2 mM de piruvato, na presença dos compostos em diferentes concentrações (0,1; 1; 10; 100 μM) e na presença de DMSO 0,1%, e meio de cultura livres de compostos. As placas

foram mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 48 horas. Após esse período, os poços contendo as lamínulas foram lavados com PBS, as células foram fixadas com metanol e em seguida coradas com Giemsa-May-Grünswald e montadas sobre lâminas. A avaliação do número de macrófagos infectados e o número de amastigotas em 100 macrófagos foi feita com auxílio de microscópio óptico com objetiva de imersão (100X), conforme a metodologia de Nunes et al. (2005).

3. Extração da enzima DNA topoisomerase IB de *L. chagasi* (LcTopIB), avaliação da atividade e inibição da atividade enzimática de LcTopIB.

3.1. Obtenção do extrato enzimático contendo topoisomerase IB de *L. chagasi*

Um extrato enzimático foi obtido a partir do concentrado de formas promastigotas (1×10^9 céls/mL) de *L. chagasi*, conforme a metodologia descrita por Jean-Moreno et al. (2006) com adaptações. As formas promastigotas foram submetidas à centrifugação de 1500g durante 5 minutos a 4 °C; e o sobrenadante foi descartado. As células foram ressuspensas em tampão Hepes (10 mM de Hepes-KOH pH 7,9, 1,5 de mM MgCl₂, 10 mM de KCl, 0,5 mM de DTT, 0,2 de mM Fluoreto de Fenilmetilsulfonil [PMSF] e 0,2 X Coquetel Inibidor de Protease [PIC]) e foi novamente centrifugada sob as condições descritas anteriormente. O *pellet* foi ressuspensado em 800 µL de tampão Hepes e incubado em gelo por 10 minutos, em seguida foi aplicado um ciclo de sonicação de 1 minuto. Após a sonicação, foi realizada uma centrifugação de 16000g durante 5 minutos a 4°C. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 100 µL de tampão de extração (12,5 mM de Tris-HCl pH 7,5, 10 mM de MgCl₂, 50 mM de KCl, 30 µg/ml de SFB, 5% de glicerol, 0,5 mM de DTT, 0,2 de mM PMSF e PIC). O extrato enzimático foi lisado em gelo por repetidas passagens em agulha de calibre 25 µL utilizando uma microseringa Hamilton®. Após centrifugação do lisado enzimático (16000g; 30 min; 4 ° C), a fração sobrenadante foi recuperada e misturada com o tampão de extração contendo 18% de polietilenoglicol (PEG) (p/v) e 18% de glicerol (v/v). O lisado foi incubado em gelo por 30 minutos e centrifugado a 16000g durante 30 minutos a 4 °C. A

fração sobrenadante, correspondente ao extrato enzimático, foi denominada de LcTopIB e utilizada nos ensaios de atividade e inibição da topoisomerase de *L. chagasi*.

3.2. Ensaio de avaliação da atividade do extrato enzimático (LcTopIB)

A capacidade de relaxar o DNA superenovelado, independente de ATP, é uma reação catalisada exclusivamente pela enzima TopIB, e foi mensurada conforme a descrição de Walker e Saraiva (2004) com adaptações.

Em Eppendorff foi preparada uma reação contendo diferentes concentrações (20-0,65 μ L) do extrato enzimático (LcTopIB), tampão de relaxamento (25 mM Tris-HCl (pH 7,5), 10 mM $MgCl_2$, 105 mM/mL de albumina de soro bovino (BSA), 0,5 mM DTT, 5% glicerol) e 0,5 μ g de plasmídeo pBR322. Essa reação foi incubada a 37 °C por 30 minutos, em seguida foi adicionado 4 μ L de tampão de parada (25% Dodecil sulfato de sódio [SDS], 25% Bromofenol azul-xileno e 40% sacarose). A reação foi submetida a corrida de eletroforese em gel de agarose 2% a 100 V durante 6 horas. Após o tempo de corrida em tampão TBE (90 mM Tris-borato, 2 mM EDTA), os géis foram revelados com 10 μ L de Brometo de etídio (EtBr) e visualizados sob iluminação ultravioleta (UV) usando um transiluminador com câmara acoplada a câmara escura Vilber Lourmat E1/2 C8-48 nm.

3.3. Ensaio de inibição da atividade de LcTopIB e hTopIB

A inibição da atividade de LcTopIB foi avaliada através do efeito inibitório dos flavonoides naringenina e da isoramnetina. Os testes foram realizados nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,15 μ M. Em Eppendorf independentes para cada concentração, foram colocados 2 μ L da substância e 5 μ L de extrato enzimático; a reação foi mantida em gelo durante 15 minutos. Em seguida foram adicionados 0,5 μ L de plasmídeo pBR322 (diluído em DMSO 0,1%) e 13 μ L de tampão de inibição (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 10 mM $MgCl_2$, 105 mM/ml de BSA, 0,5 mM DTT, 5% glicerol). As reações foram incubadas a 37 °C por 30 minutos. Transcorrido esse tempo, foi adicionado 4 μ L de tampão de parada e o gel foi submetido a eletroforese em gel de agarose por 6 horas a 100

V. O gel foi revelado com 10 μ L de EtBr e visualizados sob iluminação UV usando transiluminador com câmara acoplada a câmara escura Vilber Lourmat E1/2 C8-48 nm.

Para avaliar a inibição da atividade da enzima homóloga em humanos (hTopIB), foi utilizada DNA topoisomerase humana recombinante, gentilmente cedida pelo Laboratório de Farmacologia e Toxicologia da Universidade de Léon (Espanha). O procedimento experimental seguiu o mesmo protocolo aplicado nos ensaios com TopIB de leishmania

3.4. Análises estatísticas

O efeito leishmanicida foi determinado como a concentração necessária para reduzir à viabilidade celular a 50% do controle negativo (CI₅₀). Para determinar os níveis de significância entre os grupos experimentais e o controle, foram realizados os testes estatísticos de análise de variância (ANOVA) seguido do teste Dunnett, com o auxílio dos softwares GraphPad Prism versão 5.0. Os valores foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$ comparando ao grupo controle. Todos os experimentos foram realizados em triplicatas. As bandas do gel que representavam o DNA superenovelado foram analisadas usando o software Gel Analyse 2010[®] para determinar o percentual de inibição. Os valores percentuais de cada banda foram utilizados para calcular a concentração requerida para causar 50% de inibição da atividade da LcTopIB ou hTopIB (CI₅₀) utilizando o software estatístico GraphPad Prism versão 5.0.

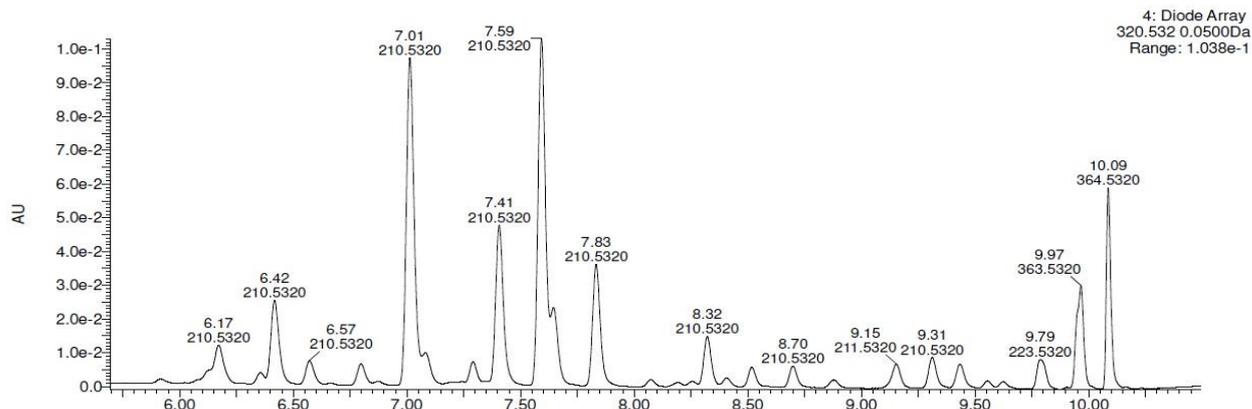
4. Resultados e discussão

4.1. Análise da FrAcEOt por UHPLC-qTOF-PDA-MS

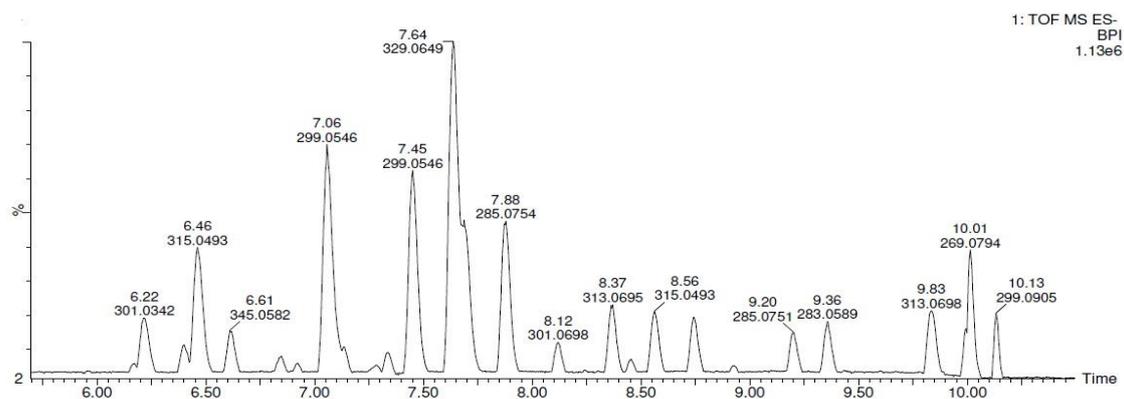
A análise da fração FrAcEOt por CCDA mostrou a presença de flavonoides quando revelada com o reagente NP (Ácido difenilbórico etanolamina). O perfil desta fração foi analisado por cromatografia líquida de ultra eficiência acoplado ao detector de arranjo de diodo (UHPLC-DAD) no comprimento de onda 340 nm e a partir da comparação com padrões de amostras de flavonoides isolados de produtos apícolas, usando espectrometria de massas de alta resolução (UHPLC-qTOF-MS/MS), foi possível identificar os compostos como flavonoides (Figura 28).

Figura 28 – UPLC-DAD (340 nm) da fração de AcOEt da própolis (A). Cromatograma dos íons base (B) obtido por MSE (UPLC-qTOF / MSE) em modo negativo.

A



B



A análise da fração FrAcEOt permitiu identificar 24 flavonoides, sendo 13 flavonóis (1, 2, 3, 7, 8, 9, 13, 14, 15, 17, 18, 21 e 22), 2 flavonas (4 e 20), 3 chalconas (10, 23 e 24) e 6 flavanonas (5, 6, 11, 12, 16 e 19). Estes flavonoides são apresentados na tabela 4.

Tabela 4 – Flavonoides identificados por UPLC-DAD-ESI(-)-QTOF-MS/MS na fração AcOEt da própolis.

	TR	λ_{\max}	[M-H] ⁻	Massa	Substância
1	6,22	359	301,0330	301,0353	Quercetina
2	6,46	356	315,0504	315,0510	Quercetina metil eter
3	6,61	352	345,0582	345,0615	Miricetina-dimetil eter
4	6,85	334	269,0437	269,0455	Apigenina
5	6,86	290	271,0240	271,0611	Naringenina
6	6,92	290	301,0703	301,0718	Trihidroxi-metoxi-flavanona
7	7,06	333	299,0546	299,0561	Kaempferol metil eter
8	7,28	352	315,0501	315,0510	Isorhamnetina
9	7,64	342	329,0649	329,0667	Quercetina-dimetil éter
10	7,88	368	285,0734	285,0768	Trihidroxi-metoxi-chalcona
11	8,12	287	301,0771	301,0717	Hesperetina
12	8,24	281	269,0811	269,0819	Pinostrobina
13	8,27	342	299,0543	299,0561	Kaempferol metil éter
14	8,37	333	313,0703	313,0717	Kumatakenina
15	8,46	362	329,0649	329,0667	Quercetina dimetil éter
16	8,56	286	315,0501	315,0510	Hesperetina metil eter
17	8,74	356	329,0641	329,0667	Quercetina dimetil éter
18	8,92	347	343,0811	343,0823	Quercetina trimetil eter
19	9,20	287	285,0751	285,0768	Isosakuranetina
20	9,36	335	283,0600	283,0619	Apigenina metil eter
21	9,83	347	313,0698	313,0717	Kaempferol dimetil éter
22	9,99	347	343,0803	343,0823	Quercetina trimetil eter
23	10,01	363	269,0801	269,0819	Dihidroxi-metoxi-chalcona
24	10,13	364	299,0905	299,0925	Dihidroxi-dimetoxi-chalcona

Vários isômeros foram identificados na FrAcEOt analisada. Composto 1, 6 e 11 com MM= 301. Compostos 2, 8, 18 com MM= 315. Compostos 4, 12, 23 com MM= 269. Composto 7, 13, 24 com MM= 299. Compostos 9, 15, 17 com MM= 329 e compostos 10, 19 com MM= 285. As Figuras 29 – 32 são espectros MS/MS representativos para cada classe de flavonoide.

Figura 29 – Espectro de ESI-MS/MS para a Quercetina-dimetil éter (9).

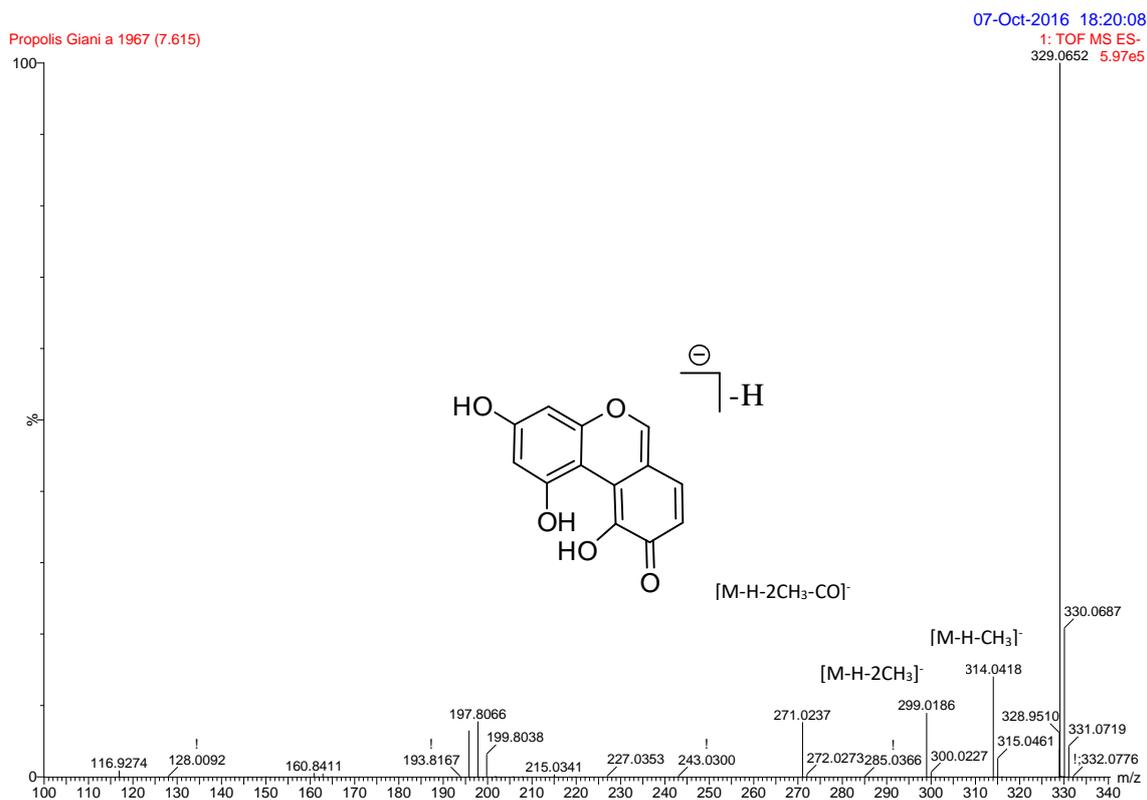


Figura 30 – Espectro de ESI-MS/MS para a Apigenina metil éter (20).

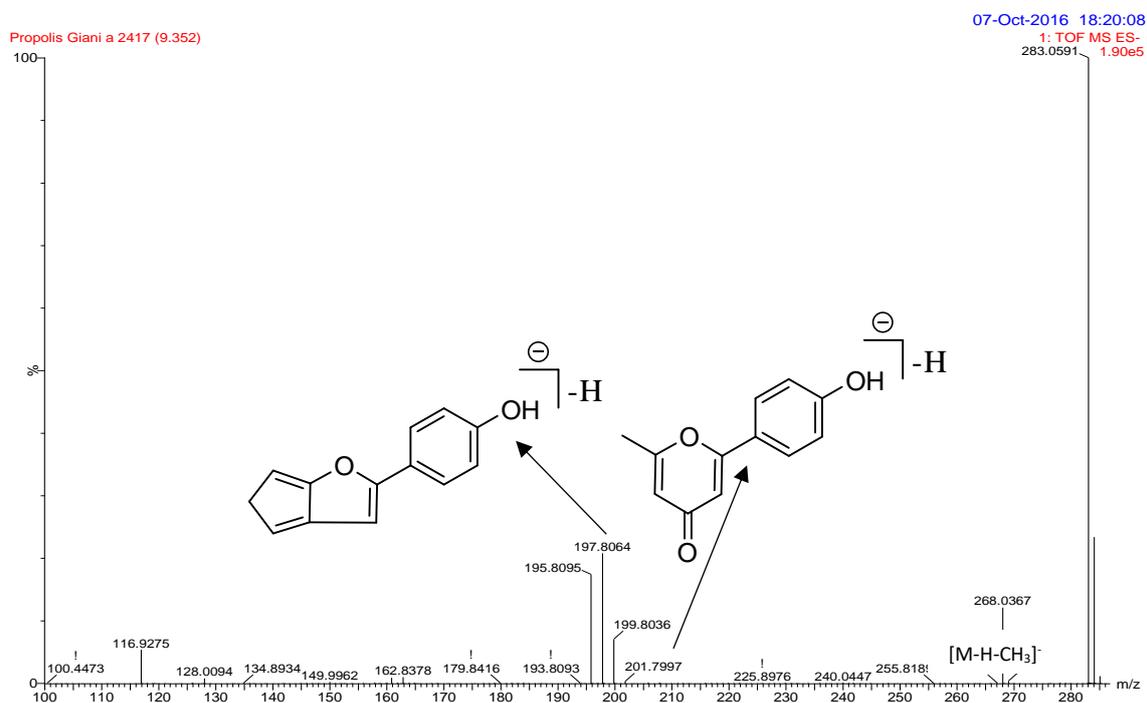


Figura 31 – Espectro de ESI-MS/MS para a Isosakuranetina (19).

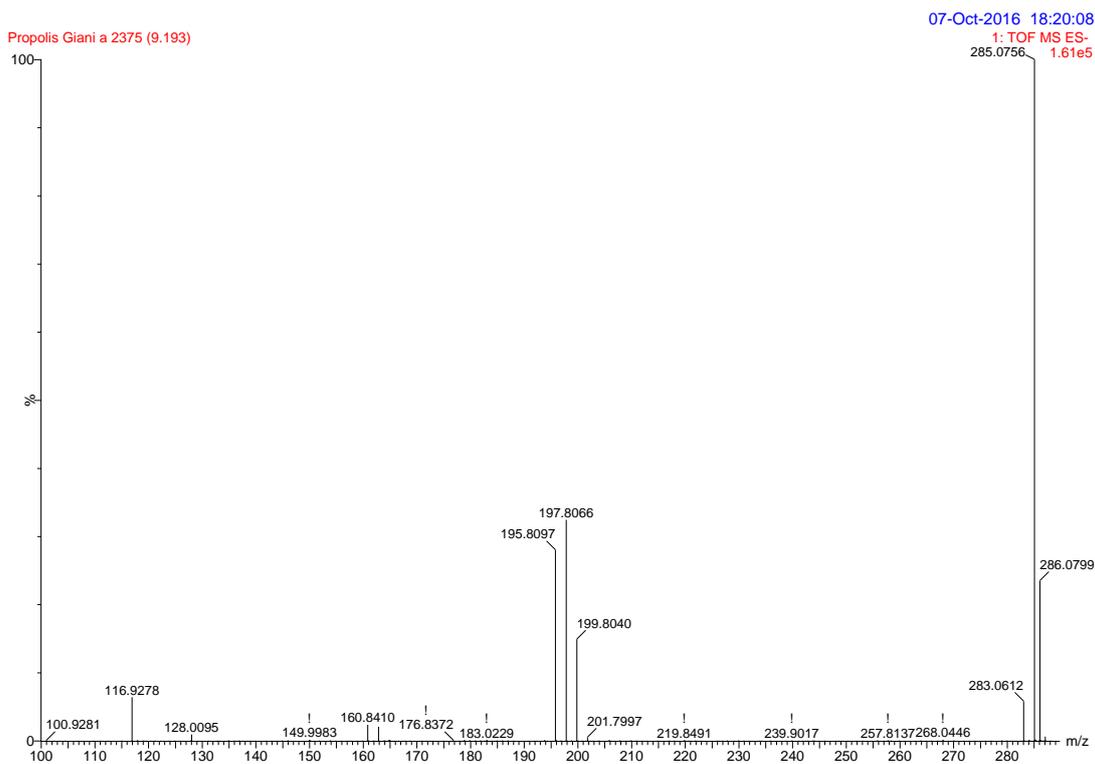
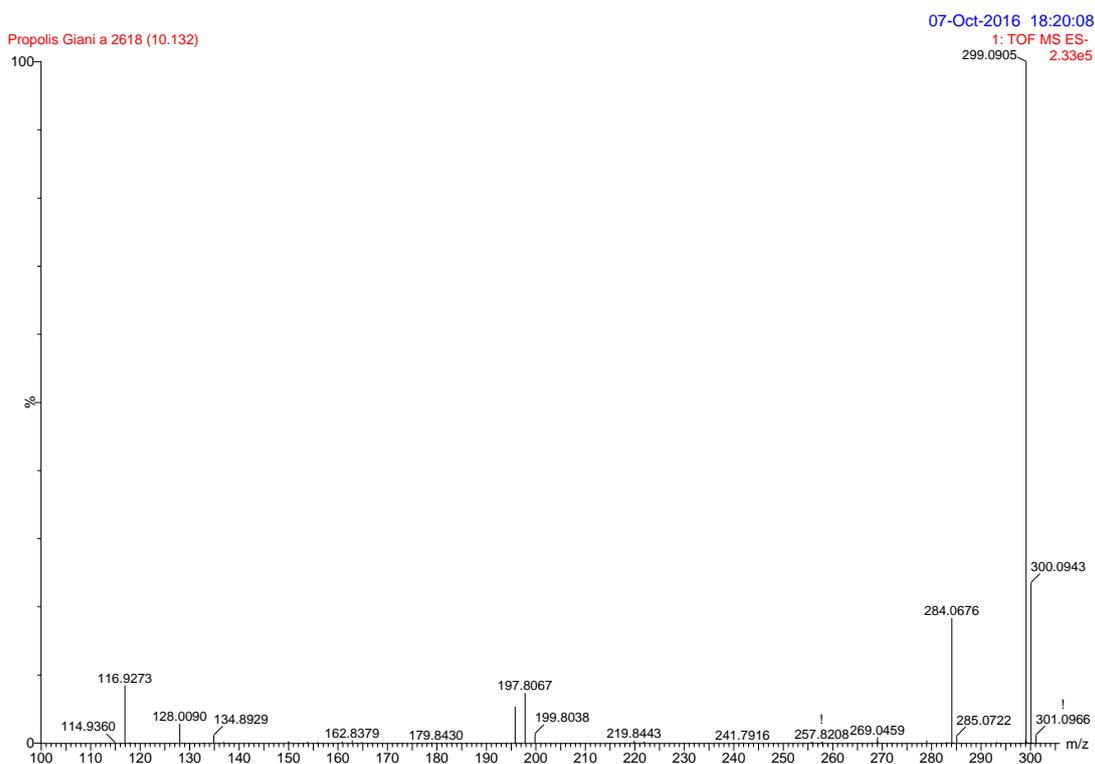


Figura 32 – Espectro de ESI-MS/MS para a Dihidroxi-dimetoxi-chalcona (24)



Segundo Popova et al. (2010), a composição química da própolis é rica e complexa, e está diretamente relacionada com a ecologia e flora de cada região visitada pelas abelhas. Deste modo as espécies de plantas que estão presentes nas regiões de onde a própolis foi coletada são muito importantes para a origem e o tipo de substância química. Particularmente para região semiárida, uma análise palinológica com amostras de própolis coletadas nesta região, mostrou que o tipo de pólen mais representativo era pertencente a espécie *Mimosa pudica* L. (Fabaceae), espécie considerada por apicultores como uma planta altamente polinizadora (MATOS et al., 2014). O estudo de Park et al (2002), identificou a presença de flavonoides em 6 diferentes amostras de própolis coletadas na região nordeste. A análise de amostras de própolis coletadas na cidade de Mossoró-RN, mostrou a presença de flavonoides (FERREIRA, 2015). Neste estudo, a presença de flavonoides foi identificada na fração de AcOEt. Como a composição química da própolis está relacionada com a flora e ecologia de cada região, a predominância de pólen oriundo de uma única espécie vegetal, bem como a presença de flavonoides em amostra de própolis coletadas em diferentes pontos da região semiárida, são indicativos para determinar a composição química da própolis desta região, sendo necessários estudos adicionais para conhecer a origem das espécies das plantas das as abelhas coletam a resina na região semiárida.

4.2. Ensaios biológicos e moleculares

4.2.1. Efeito sobre a viabilidade celular de macrófago

O ensaio de citotoxicidade em macrófagos da linhagem J774, usando o ensaio de redução de MTT, mostrou que o extrato EEtOH, as frações FrHex, FrAcOEt, FrMeOH e os flavonoides naringenina e isoramnetina não afetaram a viabilidade das células J774, após 48 horas de incubação, não sendo tóxico para essas células (Tabela 5). Orsi et al. (2005) observaram que a própolis brasileira não era tóxica para macrófagos; e Blonska et al. (2004) em ensaios de citotoxicidade com macrófagos observaram que o extrato etanólico de própolis, rico em derivados de flavona, como kaempferol e quercetina, não era tóxico para essas células. Os resultados deste trabalho estão condizentes com os da

literatura, assegurando a viabilidade de macrófagos tratados com compostos oriundos de própolis.

Tabela 5 – Efeitos do EEtOH, FrHex, FrAcEOt, FrMeOH, naringenina e isoramnetina da própolis sobre a viabilidade celular de macrófagos da linhagem J774 através do ensaio de MTT.

Tratamento	Cl₅₀^a	Citotoxicidade Máxima (%)^b
Pentamidina	44,1 ± 0,8 µM*	93,8 ± 0,7**
EEtOH	> 100	NT
FrHex	> 100	NT
FrAcEOt	> 100	NT
FrMeOH	> 100	NT
Naringenina	> 100	NT
Isoramnetina	> 100	NT

^aConcentração Letal a 50% dos macrófagos (CL₅₀) calculada através de curvas concentração-resposta tóxica. ^bMédia±erro padrão da média da citotoxicidade máxima em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de efeito máximo foram considerados significativos quando **p < 0,01 em relação ao grupo DMSO 0,1%; NT: substância não apresenta atividade letal significativa para os macrófagos nas concentrações de 100 e 10 µM em relação ao grupo DMSO.

De acordo com Silva et al. (2008), a própolis é um importante recurso de compostos com propriedades farmacológicas e funcionais, em virtude da sua variedade de substâncias, exibindo uma gama de atividades biológicas; tais como propriedades antimicrobianas, anti-inflamatória e antitumorais, que são atribuídas principalmente aos compostos fenólicos, e especialmente aos flavonoides (BURDOCK, 2008; TEERASRIPREECHA et al., 2012), sendo registrado também envolvimento no controle de mecanismos moleculares, como metabolismo de energia, defesa antioxidante, dinâmica no filamentos de actina, dobragem de proteínas, entre outros (PETELINC et al., 2013). Sendo, portanto, importante a sua não toxicidade frente às células de mamíferos.

4. 2. 2. Efeito leishmanicida sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*

Com o objetivo de investigar o efeito leishmanicida do EEtOH, FrHex, FrAcEOt, FrMeOH, naringenina e isoramnetina, foi realizado o ensaio de viabilidade sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*, através do ensaio de redução do MTT (MORAES et al., 2014). A pentamidina foi utilizada como fármaco padrão. Em geral, esse medicamento é usado como segunda escolha para o tratamento da doença, uma vez que apresenta resultados significativos em caso de resistência em tratamentos com antimoniais pentavalentes, terapia medicamentosa de primeira escolha, mas que apresenta baixa atividade sob formas promastigotas (SUNDAR et al., 2001; WHO, 2016).

Os efeitos leishmanicida do EEtOH, FrHex, FrAcEOt, FrMeOH, naringenina e isoramnetina sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* estão apresentados na Tabela 6. Enquanto os efeitos destes sobre formas promastigotas de *L. chagasi*, estão apresentados na tabela 7.

Tabela 6 – Efeitos do EEtOH, das frações FrHex, FrAcEOt, FrMeOH e dos flavonoides naringenina e isoramnetina sob formas promastigotas de *L. amazonenses*.

Tratamento	<i>L. amazonensis</i>		
	CI ₅₀ ^a	Efeito Máximo (X±DP) ^b	Efeito (10 µM)
Pentamidina	4,7±1,0 µM	97,8 ± 0,7 ^{***}	83,7±1,4 ^{***}
EEtOH	7,1±1,1 µg/mL	94,3 ± 1,9 ^{***}	57,33±4,2*
FrHex	8,2±2,6 µg/mL	96,1 ± 0,2 ^{***}	74,9±2,7 ^{**}
FrAcEOt	5,8±0,5 µg/mL	96,6 ± 1,2 ^{***}	82,2±0,5 ^{***}
FrMeOH	5,6±1,0 µg/mL	95,8 ± 1,3 ^{***}	57,3±4,2*
Naringenina	2,4 ± 1,7 µM	76,9 ± 2,4 ^{**}	56,4±1,2*
Isoramnetina	1,9 ± 0,8 µM	78,1 ± 1,9 ^{**}	58,1±4,6*

^aConcentração inibitória a 50% (CI₅₀) calculada através de curvas concentração-resposta tóxica e expressa como média±erro padrão da média; ^bEfeito máximo que é expresso como média da toxicidade máxima±erro padrão da média em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de EM foram considerados significativos quando ^{**}p < 0.01 e ^{***}p < 0.001 em relação ao grupo DMSO 0,1%.

Tabela 7 – Efeitos do EEtOH, das frações FrHex, FrAcEOt, FrMeOH e dos flavonoides naringenina e isoramnetina sob formas promastigotas de *L. chagasi*.

Tratamento	<i>L. chagasi</i>		
	CI ₅₀ ^a	Efeito Máximo (X±DP) ^b	Efeito (10 µM)
Pentamidina	6,1±0,3 µM	96,5±0,4 ^{***}	84,2±1,2 ^{***}
EEtOH	4,2±0,9 µg/mL	71,5±2,3 ^{**}	71,5±2,3 ^{**}
FrHex	6,2±1,9 µg/mL	68,6±7,5 ^{**}	68,8±4,0 [*]
FrAcEOt	6,6±0,3 µg/mL	71,5±2,4 ^{**}	75,6±2,3 ^{**}
FrMeOH	7,3±0,9 µg/mL	53,9±7,5 ^{**}	53,9±4,8 [*]
Naringenina	2,4±1,6 µM	67,8±1,9 ^{**}	68,2±1,2 [*]
Isoramnetina	2,9±1,2 µM	61,6±1,3 ^{**}	60,4±2,0 [*]

^aConcentração inibitória a 50% (CI₅₀) calculada através de curvas concentração-resposta tóxica e expressa como média±erro padrão da média; ^bEfeito máximo que é expresso como média da toxicidade máxima±erro padrão da média em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de EM foram considerados significativos quando ^{**}p < 0.01 e ^{***}p < 0.001 em relação ao grupo DMSO 0,1%.

Segundo Duran et al. (2008), a própolis é uma importante fonte de substâncias aplicadas na medicina devido às suas atividades farmacológicas, dentre as quais é possível destacar a atividade leishmanicida.

A Própolis coletada em diferentes regiões foi testada e se apresentaram ativas, no que concerne, a inibição do crescimento de formas promastigotas e amastigotas de diferentes espécies de leishmania. Duran et al. (2008) observou que o extrato etanólico da própolis mostrou-se ativo frente a espécies *L. tropica* nas concentrações de 250, 500 e 750 µg/mL, de modo que foi possível observar diferenças estatísticas significativas nas contagens de células em relação ao grupo controle (p <0,05), em ensaios *in vitro*. Nina e colaboradores (2016), testaram *in vitro*, frações fenólicas de própolis coletada na Bolívia e observaram eficácia máxima frente ao crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* (CI₅₀=12,1 µg/mL) e *L. braziliensis* (CI₅₀= 10,9 µg/mL). Machado et al. (2007), testou *in vitro*, extratos de própolis coletada em Minas Gerais, frente *L. chagasi* e observou redução significativa do crescimento de formas promastigotas (CI₅₀=11,2±0,2). Em ensaios *in vivo*, Pontin et al. (2008), observou

o efeito da própolis coletada na região norte de Minas Gerais sobre o desenvolvimento da lesão utilizando camundongos BALB/c infectados por *L. (Viannia) braziliensis*, e observou que no tratamento oral, a própolis administrada em doses de 1,5 mg/kg/dia, reduziu de forma significativa a lesão ($78,6\%; 0,30\pm 0,2$) depois de 90 dias de tratamento quando em comparação ao grupo controle ($1,4\pm 0,1$). Esses mesmos pesquisadores observaram também, que durante o mesmo período, o tratamento tópico reduziu a lesão em $84,3\% (0,22\pm 0,1)$, e o tratamento concomitante, oral e tópico do extrato, reduziu 90% o diâmetro das lesões. Ao contrário, o tratamento com glucantime reduziu 57,7% o diâmetro da lesão, mostrando assim o efeito leishmanicida do extrato de própolis rico em flavonoides.

A OMS preconiza que o ensaio de substâncias naturais, sintéticas e semissintéticas contra formas amastigotas é considerado o experimento padrão-ouro para a busca de novos compostos terapêuticos para leishmanioses, uma vez que o parasito se encontra na forma intracelular quiescente, a forma que é encontrada no hospedeiro mamífero (WHO, 2016).

4. 2. 3. Efeitos leishmanicidas sobre formas amastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*

Os efeitos leishmanicidas de EEtOH, das frações FrHex, FrAcEOt, FrMeOH e dos flavonoides naringenina e isoramnetina sobre formas amastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* estão disponíveis na Tabela 8.

Tabela 8 – Efeitos do EEtOH, das frações FrHex, FrAcEOt, FrMeOH e dos flavonoides naringenina e isoramnetina sob formas amastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*.

Tratamento	<i>Leishmania amazonensis</i>		<i>Leishmania chagasi</i>	
	CI ₅₀ ^a	Efeito Máximo (X±DP) ^b	CI ₅₀ ^a	Efeito Máximo (X±DP) ^b
Pentamidine	1,5±1,2 µM	69,2±0,4 ^{***}	1,7±0,5 µM	75,3±2,0 ^{***}
EEtOH	> 100 µg/mL	NA	> 100	NA
FrHex	1,3±0,1 µg/mL	60,4±1,4 ^{***}	> 100	NA
FrAcEOt	> 100 µg/mL	NA	> 100	NA
FrMeOH	> 100 µg/mL	NA	7,2±0,4 µM	55,2±1,0 [*]
Naringenina	1,9±1,5 µM	63,4±1,7 ^{***}	5,1±1,7 µM	67,9±2,4 ^{**}
Isoramnetina	1,4±0,9 µM	59,4±1,9 ^{**}	2,4±0,9 µM	63,4±1,6 ^{**}

^aConcentração inibitória a 50% (CI₅₀) calculada através de curvas concentração-resposta tóxica e expressa como média±erro padrão da média; ^b Efeito máximo que é expresso como média da toxicidade máxima±erro padrão da média em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de EM foram considerados significativos quando ^{**}p < 0.01 e ^{***}p < 0.001 em relação ao grupo DMSO 0,1%. Os dados são apresentados como a média±erro padrão da média. Os valores de eficácia foram considerados significativos quando ^{*}p <0,05, ^{**}p <0,01 e ^{***}p <0,01 em comparação com o grupo DMSO a 0,1%. NA: substância não apresentou atividade letal significativa para formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonenses* e *L. chagasi* até a concentrações de 10 µM em relação ao grupo DMSO.

Os resultados obtidos neste trabalho mostraram que a fração FrAcEOt e os flavonoides naringenina e isormnetina da própolis apresentaram significativos efeitos sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. chagasi* e *L. amazonensis*.

Alguns autores relatam a atividade leishmanicida da própolis frente a formas amastigotas de diferentes espécies de leishmania. De acordo com Ayres et al. (2007), o extrato etanólico da própolis apresentou efeito direto sobre formas amastigotas de *L. amazonensis*, até 96 horas, a 25 µg/ml. Os resultados obtidos por Santana et al. (2014) em ensaios *in vitro* usando o extrato etanólico e as frações acetato, diclometano e hexano, oriundos de própolis coletada na Região Semiárida do estado do Piauí/Brasil, reduziram significativamente o número de formas amastigotas, quando comparados o número de amastigotas em macrófagos tratados e não tratados.

De acordo com Debiaggi et al. (1990), os flavonoides são substâncias abundantemente presentes na própolis e são os principais compostos bioativos

destas resinas. Os flavonoides são os principais responsáveis pelas atividades biológicas da própolis, como antibacteriana, antiprotozoária, antifúngica, antiviral, dentre outras (BANSKOTA et al., 2001). Neste trabalho os flavonoides naringenina e isoramnetina, presentes na própolis, foram testados e apresentaram atividade leishmanicida moderada para formas promastigotas de *L. amazonenes* e *L. chagasi*, resultados condizentes com os obtidos por Greecco et al. (2012), que testou esses mesmos flavonoides, isolados de *Baccharis retusa*, e obteve atividade moderada para formas promastigotas. Tasdemir et al. (2006) também observaram que os flavonoides isoramnetina ($CI_{50}= 3,8 \mu\text{g/mL}$) e naringenina ($CI_{50}= 5,0 \mu\text{g/mL}$) inibiram o crescimento de formas amastigotas de *L. donovani*, em ensaios *in vitro* e *in vivo*.

4. 2. 4. Ensaios de extração, atividade e inibição da atividade do extrato enzimático contendo LcTopIB.

O estudo do mecanismo de ação de substâncias bioativas que compõem a lista de candidatos a fármacos pode fornecer informações importantes sobre novos alvos bioquímicos (SOARES-BEZERRA et al., 2004). A própolis é utilizada em ensaios de investigação de atividades biológicas, incluindo atividade leishmanicida; assim como seus modos de ação frente a potenciais alvos quimioterápicos objetivando a inibição de vias metabólicas vitais e específicas do parasita (BURDOCK, 2008).

Baseado nas metodologias de Jean-Moreno et al. (2006) e Walker e Saraiva (2004), foi possível realizar a extração da enzima topoisomerase de *L. chagasi*, com rendimento de 50 μL por extração, valor próximo aos obtidos pelos autores. Por não ser comercializada, a extração da enzima topoisomerase de leishmania é uma das formas disponíveis para obter a enzima, quer seja para utilizar o extrato enzimático, como para obter as enzimas purificadas, a partir de metodologias de expressão genética e clonagem (GONZÁLEZ et al., 2007).

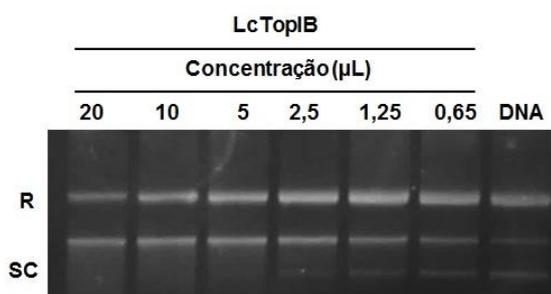
Como a metodologia aplicada não permitiu o isolamento da enzima, foi necessário realizar um ensaio de atividade enzimática, com o objetivo de confirmar a presença da TopIB, no extrato enzimático obtido e determinar a capacidade da TopIB em relaxar o DNA superenovelado, e assim estabelecer o conceito de unidade enzimática ($\text{U}/\mu\text{L}$). Para tanto, foi realizado ensaios de

diluição seriada 1:2 partindo de 20 μL da proteína concentrada, como substrato da enzima foi utilizado 0,5 μg de plasmídeo pBR322 cujo percentual de superenovelamento era 90%.

Neste estudo foi investigado a ação dos flavonoides naringenina e isoramnetina frente à enzima topoisomerase IB de *Leishmania* e humana. Esta enzima catalisa a mudança na topologia da molécula de DNA e, quando inibida, a molécula passa a ocupar grande espaço no interior celular e suas extremidades livres determinam a síntese descontrolada de proteínas, ocasionando a morte celular (CONSTANTINO et al., 1995; MITTRA et al., 2000).

A análise do gel de agarose permitiu definir 5 μL de LcTopIB como a quantidade de enzima necessária para relaxar completamente 0,5 μg de DNA superenovelado durante 30 minutos a 37 °C (Figura 33). Como critério geral se entende que o DNA está totalmente relaxado quando não se encontra presente a banda de DNA correspondente ao DNA superenovelado (SC).

Figura 33 – Quantificação da atividade de LcTopIB para validação do extrato enzimático em ensaio de relaxamento do DNA superenovelado (plasmídeo pBR322) mediante diluições seriadas 1:2.

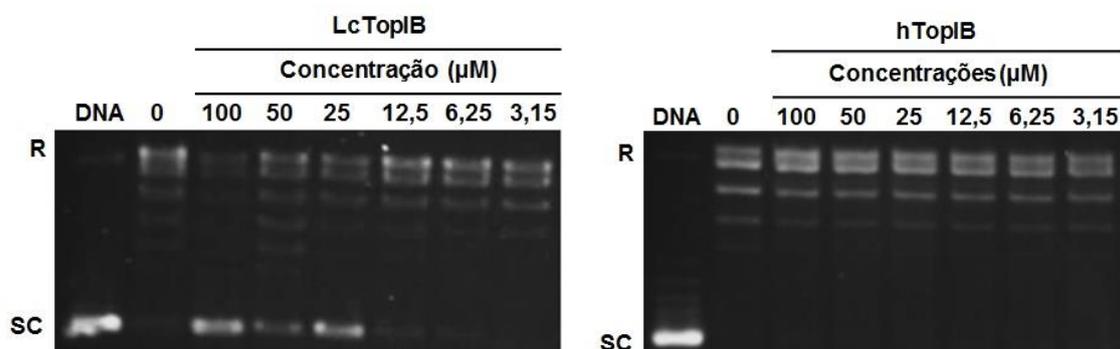


R (DNA relaxado); SC (DNA superenovelado).

Os resultados apresentados nas Figuras 34 e 35 mostram os efeitos da naringenina e isoramnetina, respectivamente, sob a capacidade de relaxamento do DNA superenovelado pelas enzimas LcTopIB e hTopIB em presença e ausência dos flavonoides naringenina e isoramnetina. A reação contendo 5 μL de TopIB e 2 μL de flavonoide na presença de 0,5 μg de DNA de plasmídeo pBR322 superenovelado, foi monitorada ao longo de 30 minutos de incubação a 37 °C. A naringenina inibiu a atividade de LcTopIB a partir da concentração de

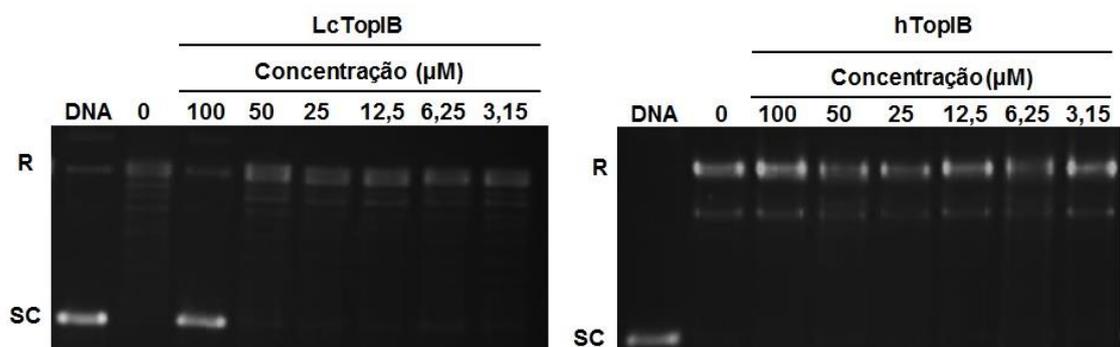
25 μM ($\text{CI}_{50}=1,73\pm 1,0 \mu\text{M}$), enquanto a isoramnetina foi capaz de inibir apenas na concentração de 100 μM .

Figura 34 – Efeito da naringenina sobre as enzimas LcTopIB e hTopIB, utilizando o ensaio de relaxamento de DNA superenovelado.



DNA (plasmídeo sem TopIB); 0 (1 U de TopIB sem inibidor), R (DNA relaxado); SC (DNA superenovelado).

Figura 35 – Efeito da isoramnetina sobre as enzimas LcTopIB e hTopIB, utilizando o ensaio de relaxamento de DNA superenovelado.



DNA (plasmídeo sem TopIB); 0 (1 U de TopIB sem inibidor), R (DNA relaxado); SC (DNA superenovelado).

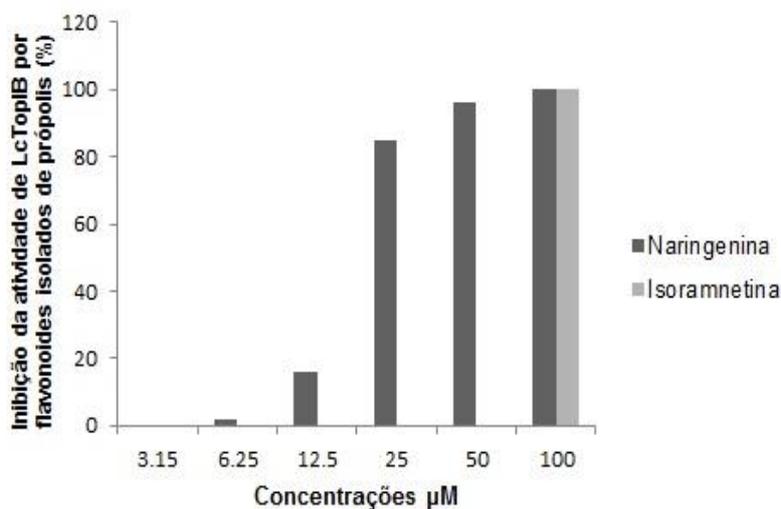
Das et al. (2006) registaram inibição da topoisomerase IB de *Leishmania donovani* pelos flavonoides luteolina, quercetina e bacaleína nas concentrações de 30 μM , com percentuais de inibição similares ao fármaco camptotecina. Mitra et al. (2000), observaram inibição da atividade de TopII de *Leishmania donovani* pelos flavonoides quercetina, luteolina, rutina e isoorientina, em concentrações variando de 200 a 12,5 μM .

Com o auxílio do software Gel Analyse 2010[®], foi possível calcular percentual de inibição da atividade de LcTopIB pelos flavonoides naringenina e

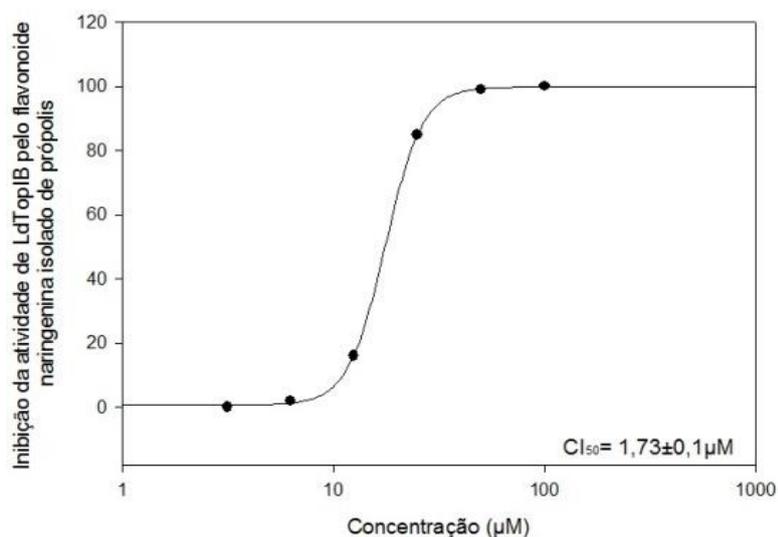
isoramnetina e determinar o valor da CI_{50} pelo cálculo da curva-dose resposta (Figura 36), e assim estabelecer a quantidade mínima necessária de substância para inibir em 50% a atividade enzimática. Os valores obtidos neste estudo estão semelhantes aos obtidos por Das et al. (2006) e Mitra et al. (2000).

Figura 36 – Percentuais de inibição da atividade de LcTopIB pelos flavonoides naringenina e isoramnetina. (A) Análise comparativa dos percentuais de inibição da atividade de LcTopIB pelos flavonoides naringenina e isoramnetina. (B) Curva dose-resposta da inibição da atividade de LcTopIB pelos flavonoides naringenina para cálculo de CI_{50} .

A



B



Para comprovar a inibição seletiva dos flavonoides da própolis frente a LcTopIB, os flavonoides naringenina e isoramnetina foram testados em diferentes concentrações (100-3,12 μM) sobre a atividade de relaxamento de hTopIB, conforme apresentado nas figuras 35 e 36. Os resultados apontam que estes flavonoides não foram capazes de inibir a atividade de hTopIB, após o monitoramento, através de ensaios independentes, ao longo de 30 minutos de incubação a 37 °C, de uma mistura contendo 5 μL de hTopIB com 2 μL de naringenina e isoramnetina na presença de 0,5 μg de plasmídeo pBR322. Os dados obtidos neste estudo estão de acordo com os resultados do estudo de Zhang et al. (2014), que realizando o ensaio de relaxamento do DNA superenovelado usando plasmídeo pBR322, observou que os flavonoides isoramnetina, naringenina, quercetina e kampferol não inibiram a atividade da topoisomerase I de células humanas.

Embora tenha sido encontrado registro de atividade leishmanicida *in vitro* e *in vivo* para os flavonoides naringenina e isoramnetina (TASDEMIR et al., 2006), não foram encontrados estudo que tenha investigado a ação destes flavonoides sob a atividade enzimática de topoisomerase de Leishmania, sendo os dados registrados neste estudo inéditos.

5. Conclusões

- Nos ensaios de atividade leishmanicida frente a formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* a fração FrAcEOT e os flavonoides naringenina e isoramnetina apresentaram os melhores resultados sobre inibição de crescimento destas espécies.
- Os flavonoides naringenina e isoramnetina quando testados em ensaios moleculares de inibição da atividade enzimática de TopIB de leishmania, foram capazes de inibir a partir de 25 μM , para naringenina, e 100 μM para isoramnetina. Esses mesmos flavonoides não inibiram a atividade da enzima homóloga humana.
- A expressiva atividade inibitória sob o crescimento de formas amastigotas de *L. amazonenses* e *L. chagasi* e a capacidade de inibir de forma seletiva a atividade da enzima topoisomerase IB de leishmania, coloca os flavonoides naringenina e isoramnetina presentes na própolis coletada na região semiárida da Bahia, Brasil, como fontes promissoras para quimioterapia das leishmanioses.
- De modo geral, em virtude da particularidade da própolis, em relação a sua composição química, dependente de fatores bióticos e abióticos da região aonde é coletada, os resultados obtidos nesse estudo em relação a atividade leishmanicida e mecanismo de ação da própolis coletada na Bahia, evidenciam que esse produto é uma fonte promitente para o desenvolvimento de novos fármacos quimioterápicos para tratar leishmanioses.

6. Referências Bibliográficas

AYRES, D. C.; MARCUCCI, M. C.; GIORGIO, S. Effects of Brazilian propolis on leishmania amazonensis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 102, n. 2, p. 215–220, 2007.

BALANÑA-FOUCE, R.; ÁLVAREZ-VELILLA, R.; FERNANDEZ-PRADA, C.; GARCIA-ESTRADA, C.; REGUERA, R. M. Trypanosomatids topoisomerase revisited new structural findings and role in drug Discovery. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drugs resistance**, v.4, p.326-337, 2014.

BANSKOTA, A. H.; TEZUKA, Y.; ANDYANA, L. K. Hepatoprotective and anti-Helicobacter pylori activities of constituents from Brazilian propolis. **Phytomedicine**, v.8, p.16-23, 2001.

BLONSKA, M.; BRONIKOWSKA, J.; PIETSZ, G.; CZUBA, Z. P.; SCHELLER, S. KROL, W. Effects of ethanol extract of propolis (EEP) and its flavones on inducible gene expression in J774A.1 macrophages. **Journal of Ethnopharmacology**, v.91, p.25-30, 2004.

BUFALO, M.C., CANDEIAS, J.M.G., SFORCIN, J.M. In vitro cytotoxic effect of Brazilian green propolis on human laryngeal epidermoid carcinoma (HEp-2) cells. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 6, n, 4, p. 483–487, 2009.

BURDOCK, G. A. Review of the biological properties and toxicity of Bee propolis (Propolis). **Food and Chemical Toxicology**, v.36, n.2, p.347-363, 2008.

CHOUHAN, G.; ISLAMUDDIN, M.; SAHAL, D.; AFRIN, F. Exploring the role of medicinal plant-based immunomodulators for effective therapy of leishmaniasis. **Immunotherapies and Vaccines**, v.5, n.2, p. 1-7, 2014.

CONSTANTINO, A.; MEHTA, R.; RUNYAN, C.; RAO, K.; VANGHAN, A.; MOON, R. Flavonoids as DNA topoisomerase antagonists and poisons: structure-activity relationships. **Journal Natural Products**, v.58, n.2, p.217-225, 1995.

CUNHA, L. C.; ALVES, L. D. S.; RESENDE, L. C. L.; NUNES, G. B. L.; ROLIM-NETO, P. J. A própolis no combate a tripanossomatídeo de importância médica: uma perspectiva terapêutica para doenças de Chagas e leishmaniose. **Revista de Patologia Tropical**, v.40, n.2, p.105-124, 2011.

DANTAS, A. P.; OLIVIERI, B. P.; GOMES, F. H. M.; CASTRO, S. L. Treatment of Trypanosoma cruzi infected mice with propolis promotes changes in the immune response. **Journal of Ethnopharmacology**, v.13, n.2, p.187-193, 2006.

DAS BB, SEN N, ROY A, DASGRUPTA SB, GANCULY A, MOHANTA BC, DINDA B, MAJUNDER, HK. Differential induction of *Leishmania donovani* bi-subunit topoisomerase I–DNA cleavage complex by selected flavones and camptothecin: activity of flavones against camptothecin-resistant topoisomerase I. **Nucleic Acids Research**, v. 34, n.4, p.1121–1132, 2006.

DEBIAGGI, M.; TATEO, F.; PAGANIL, L.; LUINI, M.; ROMERO, E. Effects of propolis flavonoids on virus infectivity and replication. **Journal Microbiologica**, V.13, P.207-213, 1990.

DURAN, G.; DURAN, N.; CULHA, G.; OZCAN, B.; OZTAS, H; OZER, B. *In vitro* antileishmanial activity of *Adana* propolis samples on *Leishmania tropica*: a preliminar study. **Parasitology Research**, v.102, n.6, p.1217-1225, 2008.

FALCÃO, R. A.; NASCIMENTO, P. L. A.; SOUZA, S. A.; SILVA, T. M. G.; QUEIROZ, A. C.; MATTA, C. B. B.; MOREIRA, M. S. A.; CAMARA, C. A.; SILVA, T. M. S. Antileishmanial Phenylpropanoids from the Leaves of *Hyptis pectinata* (L.) Poit. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013 doi:10.1155/2013/460613

FERREIRA, J. M. Características sensoriais, físico-químicas e atividade biológica da própolis produzida no semiárido do Estado do Rio Grande do Norte, Brasil. 2015. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciência Animal). Universidade Federal Rural do Semiárido, Mossoró, 2015.

FREITAS, S. F.; SHINIHARA, L.; SFORCIN, J. M.; GUIMARÃES, S. *In vitro* effects of própolis on *Giardia duodenalis* trophozoites. **Phytomedicine**, v.13, n.1, p.170-175, 2006.

GONZÁLEZ, R. D.; PÉREZ-PETERJO, Y.; ORDOÑEZ, D.; BALAÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R. M. Deletion study of DNA topoisomerase IB from *Leishmania donovani*: searching for a minimal functional heterodimer. **PlosOne**, v.11, p.e1177, 2007.

GRECCO, S. S.; REIMÃO, J. Q.; TEMPENO, A. G.; SARTORELLI, P.; CUNHA, R. L. O. R.; ROMOFF, F. F. P.; FERREIRA, M. J. P.; FAVERD, D. A.; LAGO, J. H. *In vitro* antileishmanial and antitrypanosomal activities of flavonones from *Bacharis retusa* B.C (Asteraceae). **Experimental Parasitology**, v.130, n.3, p.141-145, 2012.

HUSSAIN, R. F.; NOURI, A. M.; OLIVER, R. T. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. **Journal Immunology Methods**, v.160, p.89-96, 1993.

JEAN-MORENO, V.; ROJAR, R.; GOYENECHÉ, D.; COOMBS, G. H.; WALKER, J. *Leishmania donovani*: differential activities of classical topoisomerase inhibitors and antileishmanial against parasite and host cells at the level of DNA topoisomerase I and in cytotoxicity assays. **Experimental Parasitology**, v.112, p. 31-30, 2006.

MACHADO, G. M. C.; LEON, L. C.; DE CASTRO, S. L. Activity of Brazilian and Bulgarian propolis against different species of leishmania. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.102, n.1, p.73-77, 2007.

MATOS, V.R, ALENCAR, SM, SANTOS, F.AR. Pollen types and levels of total phenolic compounds in propolis produced by *Apis mellifera* L. (Apidae) in an area

of the Semi-arid Region of Bahia, Brazil. **Annais da Academia Brasileira de Ciências**, v.88, p. 407-418, 2014.

MITTRA, B.; SAHA, A.; CHOWDHURY, A. R.; PAL, C.; MANDAL, S.; MUKHOPADHYAY, S.; BANDYOPADHYAY, S.; MAJUMDER, H. K. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. **Molecular Medicine**, v.6, n.6, p.527-541, 2000.

MORAES, T. R.; COSTA-SILVA, T. A.; TEMPONE, A. G.; BORBOREMA, S. E. T.; SCOTTI, M. T.; SOUZA, R. M. F. Antiparasitic activity of natural and semi-synthetic tirucallane triperoids from *Schinus terebinthifolius* (Anacardiaceae): Structure?Activity Relationships. **Molecules**, v.19, p.5761-5776, 2014.

NAGLE, A. S.; KHARE, S.; KUMAR, A. B.; SUPEK, F.; BUCHYNSKY, A.; MATHISON, C. J. N.; CHENNAMANENI, N. K.; PENDEM, N.; BUCKNER, F. S.; GELB, M. H.; MOLTENI, V. Recent Developments in Drug Discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis. **Chemical Reviews**, v.114, n.1., p. 1305–11347, 2014.

NINA, N.; LIMA, B.; FERESIN, G. E.; GIMENEZ, A.; CAPUSIRI, E. S.; SCHENEDA, S. Antibacterial and leishmanicidal activity of Bolivian propolis. **Letters in Applied Microbiology**, v.62, n. 3, p. 290-296, 2016.

NUNES, M. P.; CYSNE-FINKELSTAIN, L.; MONTEIRO, B. C.; SOUZA, D. M.; GOMES, N. A.; DOSREIS, G. A. CD40 signaling induces reciprocal outcomes in Leishmania-infected macrophages; roles of host genotype and cytokine milieu. **Microbiology and Infectious Diseases**, v.7, p.78-85, 2005.

OLCZYK, P.; KOMOSINSKA-VASSEV, K.; WINSZ-SZCZOTKA, K.; KOZMA, E. M.; WISOWSKI, G.; STOJKO, J.; KLIMEK, K.; OLCZYK, K. Propolis modulates vitronectin, laminin and heparin sulfate/heparin. **Biomedical and Biotechnology**, v.13, n.11, p.932-941, 2012.

ORSATTI, C.L., MISSIMA, F., PAGLIARONE, A.C., BACHIEGA, T.F., BUFALO, M.C., ARAUJO JR., J.P., SFORCIN, J.M. Propolis immunomodulatory action in vivo on Toll-like receptors 2 and 4 expression and on pro-inflammatory cytokines production in mice. **Phytotherapy Research**, v. 24, n.1, p.1141–1146, 2010.

ORSI, R.; SFORCIN, J. M.; FUNARI, S. R. C.; BANKOVA, V. Effects of Brazilian and Bulgarian propolis on bactericidal activity of macrophages against *Salmonella typhimurium*. **International Immunopharmacology**, v.5, p.359-368, 2005.

PARK, Y. K.; ALENCAR, S. M.; AGUIAR, C. L. Botanical origin and chemical composition of Brazilian propolis. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.50, n.9, p.2502-2506, 2002.

PATIL, R. R.; PATIL, M. S.; KSHIRSAGAR, S. S.; CHAUDHARI, P. S.; BAYAS, J. P.; OSWAL, R. J. Synthetic and natural products against leishmaniasis: A review. **World Journal Public Health Sciences**, v. 11, n.1, p.7-22, 2012.

PETELINC, T.; POLAK, T.; JAMNIK, P. Insight into the molecular mechanisms of propolis activity using a subcellular proteomic approach. **Journal Agriculture and Food Chemistry**, v.61, n.2, p.11502-11510, 2013.

PONTIN, K.; SILVA-FILH, A. A.; SANTOS, F. F.; SILVA, M. L. A.; CUNHAM W. R.; NANAYAKKAA, N. P. D.; BASTOS, J. K.; ALBUQUERQUE, S. *In vitro* and *In vivo* antileishmanial activities of Brazilian green propolis extract. **Parasitology Research**, v.103, n.3, p.487-492, 2008.

POPOVA, M., GRAIKOU, K., CHINO, I., BANKOVA, V. GC-MS profiling of diterpene compounds in Mediterranean propolis from Greece. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v.58, n.1, p.3167-3176, 2010.

QUEIROZ, A. C.; DIAS, T. L. M. F.; MATTA, C. B.B; SILVA, L. H. A. C.; ARAUJO-JUNIOR, J. X.; ARAUJO, G. B. MOURA, F. B. P. M.; ALEXANDRE-MOREIRA, M. S. Antileishmanial Activity of Medicinal Plants Used in Endemic Areas in Northeastern Brazil. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2014 doi:10.1155/2014/478290.

SANTANA, L. C. R.; CARNEIRO, S. M. P.; CALAND-NETO, L. B.; ARCANJO, D. D. R.; MOITA-NETO, J. M.; CITÓ, A. M. G. L.; CARVALHO, F. A. A. Brazilian Brown propolis elicits antileishmanial effects against promastigotes and amastigotes forms of *Leishmania amazonensis*. **Natural Products Research**, v.28, n.5, p.340-343, 2014.

SFORCIN, J. Biological Properties and therapeutic applications of propolis. **Phytotherapy Research**, v.30, p.894-905, 2016.

SFORCIN, J. M.; BANKIVA, V. Propolis: Is there a potential for the development on new drugs? **Journal of Ethnopharmacology**, v.133, n.1, p.253-260, 2011.

SILVA, B. B.; ROSALEM, P. L.; CURY, J. A.; SOUZA, I.; ESTEVES, A.; ALENCAR, S. M. Chemical composition and botanical origin of red propolis a new type of Brazilian propolis. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v.5, n.1, p.313-316, 2008.

SINGH, N.; MISHA, B. B.; BAJPAI, S.; SINGH, R. K.; TIWARI, V. K. Natural product based leads to fight against leishmaniasis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v.22, n.1, p.18-45, 2014.

SOARES-BEZERRA, R. J.; LEON, C.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares com alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v.40, n.2, p.139-149, 2004.

SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Tropical Medicine International Health**, v. 6, p. 849-854, 2001.

TASDEMIR, D.; KAISER, M.; BRUN, R.; YARDLEY, V.; SCHMIDT, T. J.; TOSUM, F.; RUEDI, P. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of

flavonoids and their analogues: In vitro, in vivo, structure-activity relationship and quantitative structure activity relations studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v.50, n.4, p.1350-1364, 2006.

TEERASRIPEECHA, D.; PHUWAPRAISIRIAN, P.; PUTHONG, S.; KIMURA, K.; OKUYAMA, M.; MORI, H.; KIMURA, A.; CHANGAO, C. *In vitro* antiproliferative/activity cytotoxic on cancer cell f a cardanol and a carnaed enriched from thai *Apis mellifera* propolis. **BMC Complementary and alternative medicine**, v.12, n.27, p.1-17, 2012.

TORETI, V. C.; SATO, H. I.; PASTORE, G. M.; PARK, Y. K.; Recent progress of propolis for its biological and chemical compositions and its botanical origin. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine.**, v.2013, p.1-13, 2013.

WALKER, J.; SARAIVA, N. G. Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote DNA topoisomerase I and human monocyte DNA topoisomerase I and II antimonial drugs and classical antitopoisomerase agents. **Journal of Parasitology**, v.90, n.5, p.1155-1162, 2004.

WANG, Z., AND ENGLUND, P.T. RNA interference of trypanosome topoisomerase causes progressive loss of mitochondrial DNA. **Journal European Molecular Biology Organization**, v. 20, p. 4674–4683, 2001

WHO. Leishmaniasis: disease burden and epidemiological trends. Special Programme for Research and Training in Tropical Diseases. Diponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases/leish/files/direction.pdf>>. Acesso em: 09 de dezembro de 2016.

WONG, I. L. K.; CHAN, K. F.; CHEN, Y. F.; LUN, Z. R.; CHAN, T. H.; CHOW, L. M. C. In vitro and in vivo efficacy of novel flavonoid dimers against cutaneous leishmaniasis. **Antimicrobial agents chremotherapy**, v.13, n.2, p. 87-96, 2014.

ZAMAMI, Y., TAKATORI, S., KOYAMA, T., GODA, M., IWATANI, Y., DOI, S., KAWASAKI, H. Effect of propolis on insulin resistance in fructose-drinking rats. **Natural Product Research**, v.127, n.2, p.2065–2073, 2007.

ZHANG, H.; ZHANG, Y. W.; YASUKAWA, T.; ROSA, I. D.; KHIATI, S.; POMMIER, Y. Increased negative supercoiling of mtDND in Top1mt knockout mice and presence of topoisomerase I α and I β invertebrate mitochondria. **Nucleic Acid Research**, v.42, n.11, p.7259-7267, 2014.

Atividade leishmanicida e avaliação da inibição seletiva das enzimas topoisomerases IB de *Leishmania* sp. e humana por alcaloides naturais, sintéticos e modificados

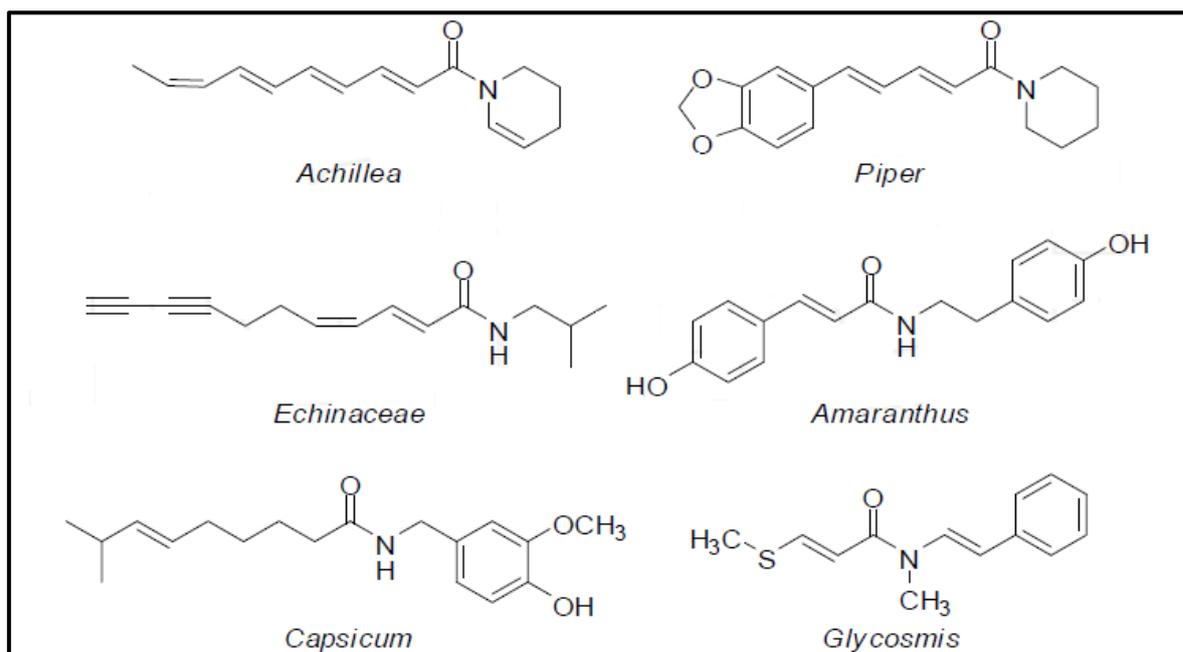
1. Introdução

As alcanidas são metabolitos secundários amplamente distribuídos em plantas, que se formam ao combinar duas diferentes rotas metabólicas (BAUER; REMINGER, 1989). Estas amidas já foram encontradas em pelo menos 33 famílias de plantas, com destaque para as famílias Aristolochiaceae, Asteraceae, Brassicaceae, Convolvulaceae, Euphorbiaceae, Menispermaceae, Piperaceae, Poaceae, Rutaceae e Solanaceae (RAMIREZ-CHAVEZ et al., 2004). De acordo com Greger (1984), as alcanidas formam uma classe distinta de produtos naturais em que diferentes partes de amina são combinadas por uma ligação amida com vários ácidos graxos insaturados. Embora as alcanidas tenham diferentes cadeias, a maioria delas contém um conjugado com o grupo amida substituído com um grupo *N*-isobutila.

Estruturalmente, as alcanidas contêm uma amina alifática, cíclica ou aromática, e uma cadeia saturada ou insaturada de 8 a 18 carbonos, que inclui ligações duplas ou triplas, ou ambas; sua classificação é baseada no número de insaturações nas cadeias, sendo então dividida em alcanidas olefínicas (com apenas ligações duplas) e acetilênicas (com pelo menos uma ligação tripla) (BAUER; REMINGER, 1989; MOLINA-TORRES; CHÁVEZ, 2001).

As espécies vegetais produtoras de alcanidas mais importantes são: *Heliopsis longipes*, a primeira planta de onde se extraíram alcanidas, *Acmella radicans*, *Echinacea purpurea*, *Achillea millefolium*, *Zanthoxylum piperifum* e *Capsicum annum* (MULLER-JAKIC et al., 1994; BAUER; REMINGER, 1989). Características como o comprimento de cadeia de carbono, a insaturação, a estereoquímica, e os resíduos de amina são típicos de cada família e gênero de plantas de tal forma que servem como critérios quimiotaxonômicos (Figura 37) (RIOS, 2012).

Figura 37 – Alcamidas que ocorrem em diferentes gêneros de plantas.



Fonte: (RIOS-CHAVEZ, *In vitro Cell Development Biology of Plants*, 2012).

Historicamente o interesse pelas alcamidas deve-se a capacidade anti-inflamatória de alguns de seus derivados, usados medicinalmente nos tempos antigos, particularmente para casos de dor de dente (GREGER, 2015). A atividade anti-inflamatória de alcamidas foi relatada por Chen et al. (2005), que mensurou a inibição de ácido nítrico (NO) em células RAW264.7, e observou que uma mistura de alcamidas, oriundas do gênero *Echinacea*, reduziu significativamente mediadores pró-inflamatórios. Hou et al. (2011) investigou a atividade anti-inflamatória de alcamidas *in vivo* e observou uma associação direta entre efeito protetor na hepatite aguda induzida por LPS/D-GalN (lipopolisaccharideo amelioratos), em lesão hepática e a concentração de alcamidas.

Entretanto, a partir da década de cinquenta outras atividades biológicas das alcamidas começaram a ser relatada, principalmente a atividade inseticida (JACOSON, 1951; JACOBSON, 1971; MIYAKADO et al., 1989; MORENO et al., 2011). Atualmente uma gama de atividades biológicas é relatada para as alcamidas (GREGER et al., 2015). Cruz et al. (2014), relataram atividade antimicrobiana e antifúngica de alcamidas isoladas de espécies do gênero

Equinacea, onde células de *S. cerevisiae*, expostas a diferentes concentrações de cada uma das sete alcanidas isoladas, exibiram aumento nos números de danos na parede celular e morte, resultados estes significativos quando comparados ao controle caspofungina, uma droga antifúngica lipopeptídica da nova classe de equinocandinas. A atividade antiparasitária de alcanidas já foi relatada em ensaios frente a *Plasmodium falciparum*, através da atividade inibitória do crescimento parasitário pelas substâncias espilantol e ácido isobutilamida undeca-2*E*-eno-8,10, diinóico, isoladas da espécie *Spilanthes acmella* (SPELMAN et al., 2011). Althaus e colaboradores (2014) testou a atividade antiparasitária de alcanidas isoladas da espécie *Achillea ptarmica*, frente a espécies de *Trypanossoma brucei* e *Leishmania donovani* e esses compostos inibiram o crescimento destes parasitas apresentando valores de concentração inibitória mínima de 2,0 µg/mL e 5,96 µg/mL, respectivamente. Araújo et al. (2016) testaram um análogo de alcanida, isolada da espécie *Aniba riparia*, e este análogo apresentou atividade leishmanicida significativa contra espécies de *L. amazonensis* (CI₅₀= 81,8 µg/mL).

Embora tenham sido encontrados, na literatura, relatos de atividade leishmanicida de alcanidas, uma lacuna é observada quanto à exploração do potencial desses compostos como um promitente leishmanicida, em especial no que concerne aos seus mecanismos de ação.

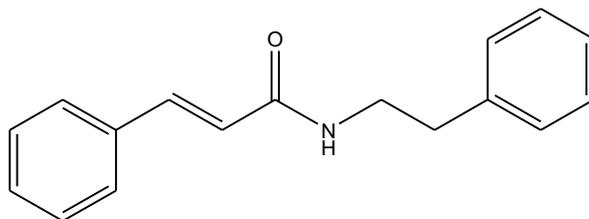
Neste contexto o presente trabalho teve como objetivo investigar a atividade leishmanicida de alcanidas naturais, sintéticas e modificadas, frente as espécies *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. infantum* iRF70, bem como investigar a ação destas substâncias sobre a atividade enzimática de topoisomeraase IB recombinante de leishmania (LdTopIB) e humana (hTopIB).

2. Materiais e Métodos

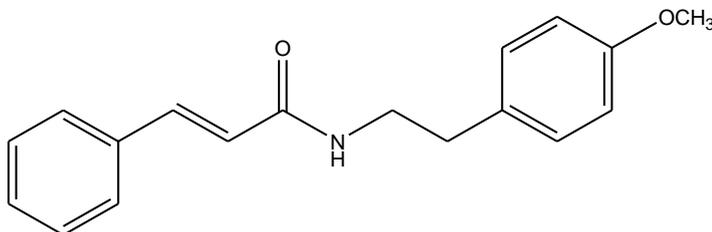
2.1. Obtenção de alcanidas

As alcanidas usadas nesta pesquisa foram sintetizadas por Rodrigo Albuquerque da Costa e Dr. Celso de Amorim Câmara, coordenador do Laboratório de Síntese de Compostos Bioativos da Universidade Federal Rural de Pernambuco (UFRPE). Uma série de 16 alcanidas (56-69) denominadas de RAC (Figura 38), foi utilizada em ensaios de atividade citotóxica em células de mamíferos (Macrófago J774), em ensaios de viabilidade celular frente a formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. infantum* iFR70 e em ensaios de inibição da atividade enzimática de topoisomerase recombinante de *Leishmania* e topoisomerase humana.

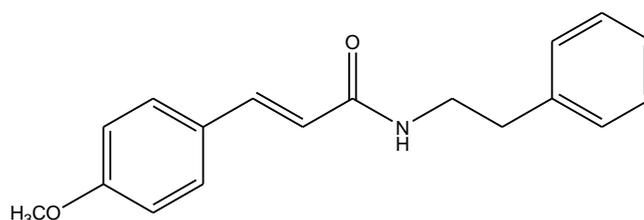
Figura 38 – Alcanidas naturais, sintéticas e modificadas utilizadas nos ensaios biológicos e moleculares com *Leishmania* sp.



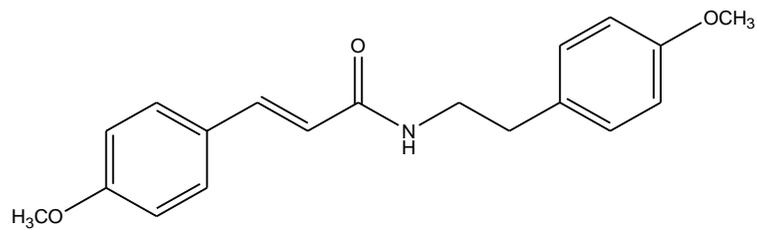
RAC 1 (56)



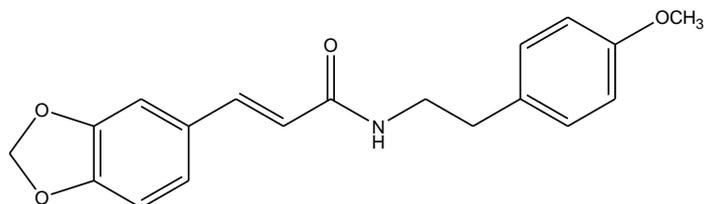
RAC 2 (57)



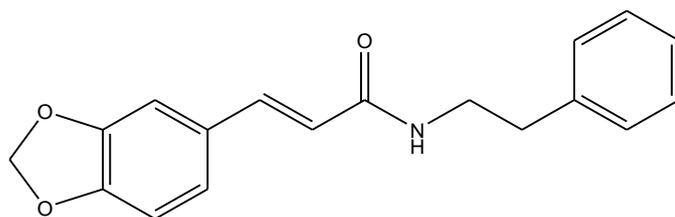
RAC 3 (58)



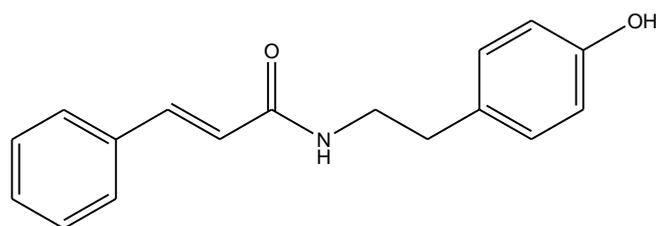
RAC 4 (59)



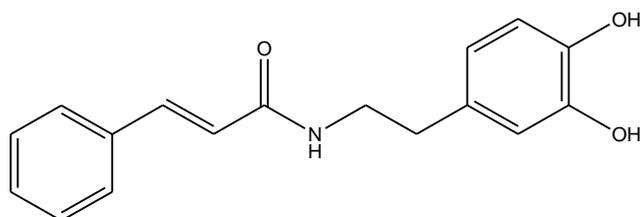
RAC 5 (60)



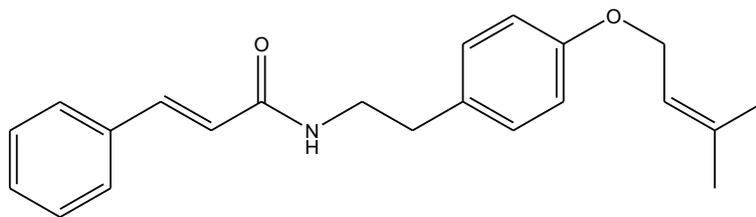
RAC 6 (60)



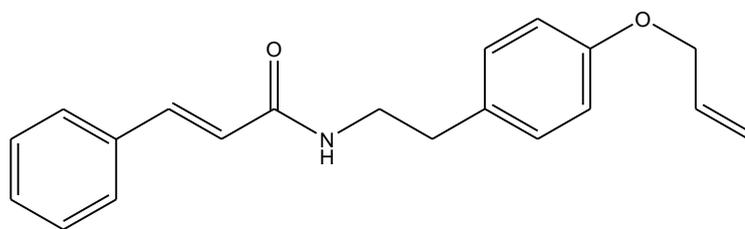
RAC 7 (60)



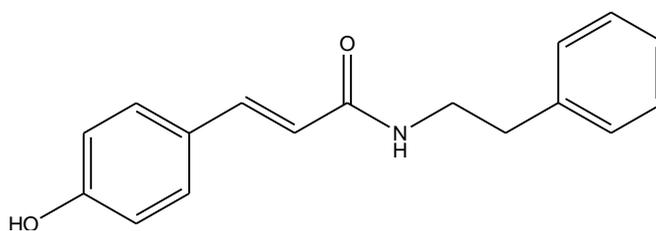
RAC 8 (61)



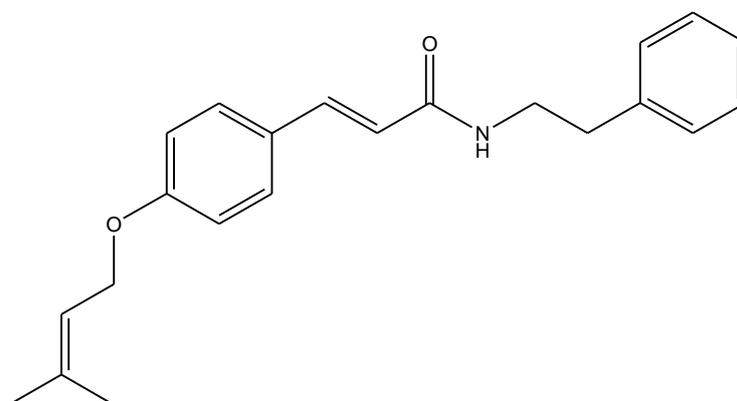
RAC 9 (62)



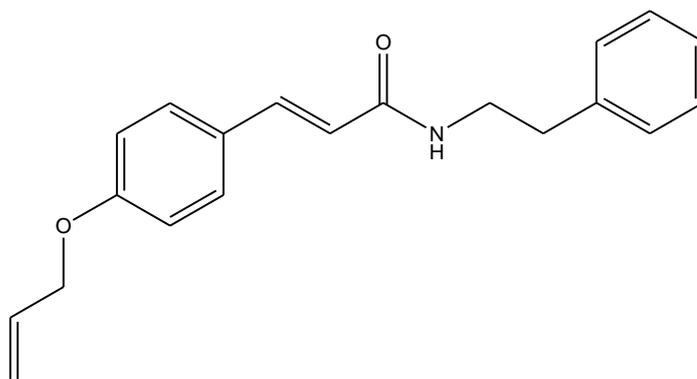
RAC 10 (63)



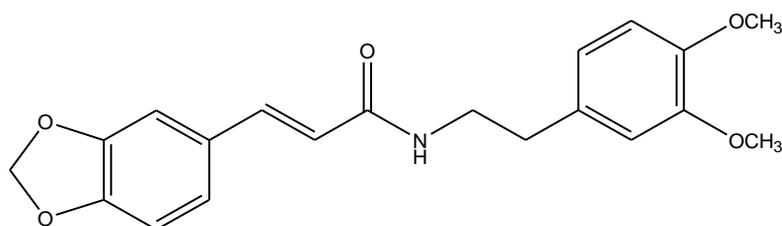
RAC 11 (64)



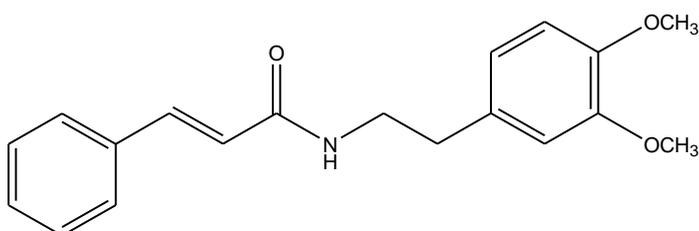
RAC 12 (65)



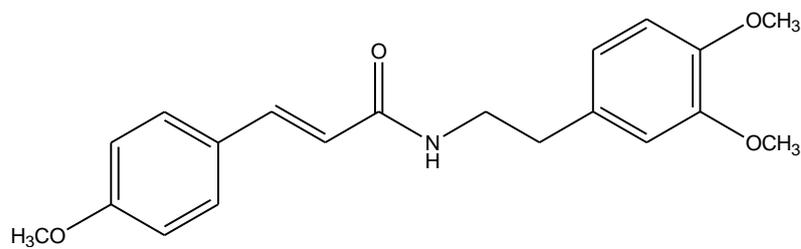
RAC 13 (66)



RAC 14 (67)



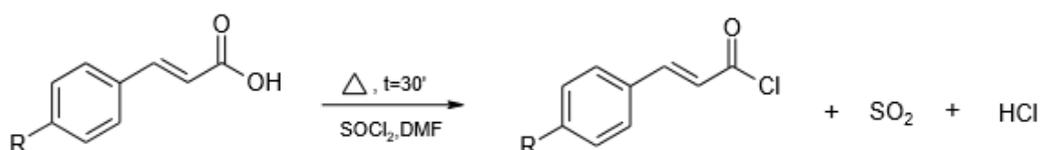
RAC 15 (68)



RAC 16 (69)

Para a preparação das alcamidas foram realizadas as seguintes reações: (a) Preparação de cloreto de ácidos. (b) Preparação das amidas a partir de cloreto de ácido e amina e (c) Aminólise da feniletilamina com o p-hidroxicinamato de metila. Para a formação dos haletos de ácido, utilizou-se como fonte de cloreto o SOCl_2 e como catalizador da reação o *N,N*-dimetilformamida (DMF), com aquecimento ou não das reações. De um modo geral a preparação dos cloretos a partir dos ácidos foi realizada de acordo com a reação da Figura 39. Após a síntese dos cloretos de ácidos, realizou-se uma reação de substituição nucleofílica com as feniletilaminas devidamente funcionalizadas, estas com um par de elétrons livres comportam-se como nucleófilos. O HCl liberado durante a reação foi neutralizado pela utilização de aminas terciárias, como a trietilamina $\text{N}(\text{Et})_3$, formando o sal cloreto de trietilamônio. A mistura reacional ficou com ou sem aquecimento dependendo da reação, e sob agitação magnética. Todas as alcamidas foram obtidas de acordo com a reação exemplificada na reação do composto protótipo 1, descrito na Figura 40. As alcamidas alquiladas foram obtidas a partir da alquilação daquelas com brometo de prenila e de alila e carbonato de potássio em acetona. Uma reação ácido-base acontece respectivamente entre a hidroxila fenólica e o carbonato de potássio, formando um sal de potássio. Os produtos das reações foram obtidos com os rendimentos de 67-98%. Todas as substâncias foram identificadas por infravermelho, espectroscopia de ressonância magnética nuclear de ^1H e ^{13}C , incluindo 2D e espectrometria de massas.

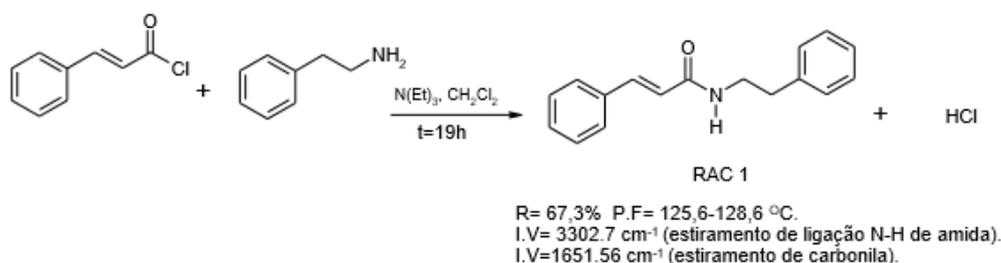
Figura 39 – Preparação dos cloretos a partir dos ácidos.



O planejamento para obtenção das substâncias utilizadas neste trabalho, foi baseado nas alcamidas *N*-coumaroiltiramina e *N*-cafeoiltiramina, isoladas pela primeira vez no gênero *Solanum* (*S. paludosum*, Solanaceae) (SILVA et al.

2002). Este planejamento permitiu uma grande diversidade estrutural, através da adequada funcionalização de diferentes pontos de modificação molecular na estrutura do protótipo (Figura 40), resultando em um mapeamento amplo da relação estrutural química e atividade biológica nesta classe de compostos.

Figura 40 –Reação do composto protótipo 1.



2.2. Ensaio biológicos e moleculares

Os ensaios *in vitro* de citotoxicidade em macrófagos J744 e de atividade leishmanicida em *L. amazonensis* e *L. chagasi*, foram realizados no Laboratório de Farmacologia e Imunidade (LaFI) da Universidade Federal de Alagoas (UFAL), sob a orientação da Dra. Magna Suzana Alexandre Moreira.

Os ensaios de atividade leishmanicida com cepas de *L. infantum* iFRP 70 e os ensaios moleculares com topoisomerase recombinantes de Leishmania e humana, foram realizados no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia da Universidad de León (Espanha) sob a orientação do Dr. Rafael Balaña-Fouce, durante a realização do estágio doutoral (Doutorado Sanduíche) pelo Programa Ciência sem Fronteira do Conselho Nacional de Pesquisa (CNPq).

2.2.1. Manutenção de macrófagos

Os macrófagos da linhagem J774, obtidos junto ao banco de célula da UFRJ, foram mantidos em garrafas de cultura contendo 10 mL de meio RPMI 1640 (Sigma-Aldrich®) suplementado com 10% de SFB e 2 mM de *L*-glutamina, aminoácidos não essenciais e piruvato. No momento do uso, as células foram contadas em Câmara de Neubauer e posteriormente semeadas em placas.

2.2.2. Cultura de parasitos

Formas promastigotas *L. amazonensis* e *L. chagasi* (MCAN/BR/89/BA262), gentilmente cedidas pela Dra. Valéria de Matos Borges do Centro de Pesquisa Gonçalo Moniz – Fiocruz-BA, foram mantidos *in vitro* em meio Schneider's (Sigma Aldrich), suplementado com 10% de SFB e 2% urina humana masculina a 27 °C em estufa B.O.D. Quando selecionados para uso, os parasitos foram colocados em tubos tipo Falcon e centrifugados a 3000 *rpm* durante 10 minutos. Em seguida, o sobrenadante foi descartado e o *pellet* formado foi resuspenso em meio Schneider's. Para determinar a concentração de parasitos a ser utilizado nos experimentos, após a ressuspensão, o *pellet* foi transferido para câmara de Neubauer e realizada a contagem de parasitos antes do plaqueamento.

2.2.3. Ensaio de determinação da viabilidade celular em macrófago

A viabilidade celular de macrófagos frente as substâncias RAC 1-16, foi realizada através do método de redução de MTT, conforme a metodologia descrita por Hussain et al. (1993). Macrófagos da linhagem J744 foram plaqueados em placas de 96 poços, numa concentração de 1×10^5 macrófagos por poço, e mantidos em repouso por 1 hora. Transcorridos este período, os macrófagos foram expostos a diferentes concentrações das substâncias (0,1; 1; 10; 100 e μM) diluídas em meio RPMI, e incubados em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por um período de 48 horas. Como controles, macrófagos foram cultivados em poços contendo apenas meio de cultura e em poços contendo apenas DMSO 0,1%, com organização similar aos ensaios com própolis (Figura 27).

Após as 48 horas de incubação, o sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionado 100 μL da solução de MTT (5 mg/10 mL). As placas foram novamente incubadas por 1 hora sob as mesmas condições da incubação anterior, e em seguida o sobrenadante foi descartado e adicionado 100 μL de DMSO 0,1%. Os ensaios foram realizados em triplicatas e a leitura das placas foi realizada em espectrofotômetro a 550 nm. A viabilidade celular das culturas de macrófagos tratadas com as substâncias foi comparada ao padrão de morte

obtido nas culturas controle. Para calcular a CI_{50} foi utilizada a fórmula: **Resposta**
= $100 + (-100) / 1 + 10^{(X - \text{Log}CI_{50})}$.

2.2.4. Ensaio de atividade leishmanicida sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*

O efeito das substâncias RAC 1-16 sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* foi realizado pelo método de redução de MTT, conforme a metodologia de Moraes et al. (2014). Formas promastigotas foram cultivadas em placas de 96 poços contendo meio RPMI suplementado com 10% SBF, 2 mM de *L*-glutamina e 2% de urina humana, na concentração de 1×10^5 células por poço. Diferentes concentrações das alcamidas (0,1; 1; 10 e 100 μM) e do fármaco padrão (Pentamidina) foram adicionados aos poços até o volume final de 200 μL . Para controle de crescimento basal foram usados meio de cultura livre de substâncias e meio de cultura contendo o solvente utilizado na solubilização das substâncias (DMSO 0,1%). As placas foram incubadas em estufa B.O.D a 27 °C por 48 horas. Após o período de incubação, o sobrenadante foi descartado e em seguida foi adicionado 20 μL de solução de MTT (2 mg/mL). As placas foram incubadas por 2 horas em estufa a 37 °C e a 5% de CO_2 . Transcorrido o período de incubação, após o descarte do sobrenadante, foi adicionado 120 μL de Isopropanol. As placas foram mantidas em repouso por 1 hora em temperatura ambiente. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 550 nm. Os ensaios foram realizados em triplicatas e os dados obtidos foram expressos como a média \pm desvio ($X \pm DP$).

2.2.5. Ensaio de atividade leishmanicida sobre formas amastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*.

Para a obtenção de formas amastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*, macrófagos da linhagem J774 foram plaqueados, na proporção de 3×10^5 células por poço, em placas de 24 poços com lamínulas e com meio RPMI suplementado e incubados em B.O.D a 27 °C. Os macrófagos foram infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*, numa proporção de 10 parasitos: 1 macrófago.

As placas contendo macrófagos e *L. amazonensis* foram incubadas por 1 hora em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂; enquanto as placas contendo macrófagos e *L. chagasi* foram incubadas por 6 horas sob as mesmas condições. Transcorrido os referidos intervalos de tempo, os macrófagos foram “lavados” com PBS com pH 7,2, para remoção dos parasitos não interiorizados; em seguida, foram cultivados em meio RPMI suplementado com 10% SBF, 2 mM de L-glutamina, 2 mM de aminoácidos não essenciais e 2 mM de piruvato, na presença dos compostos em diferentes concentrações (0,1; 1; 10; 100 µM) e na presença de DMSO 0,1%, e meio de cultura livres de substâncias. As placas foram mantidas em estufa a 37 °C com atmosfera úmida contendo 5% de CO₂ por 48 horas. Após esse período, os poços contendo as lamínulas foram lavados com PBS, as células foram fixadas com metanol e em seguida coradas com Giemsa-May-Grünswald e montadas sobre lâminas. Os ensaios foram realizados em duplicatas e a avaliação do número de macrófagos infectados e o número de amastigotas em 100 macrófagos foi feita com auxílio de microscópio óptico com objetiva de imersão (100X), conforme a metodologia de Nunes et al. (2005).

2.3. Ensaio de atividade leishmanicida sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum* marcada com a proteína infravermelho fluorescente (iFRP70)

As cepas de *L. infantum* iFRP70 foram desenvolvidas no Laboratório de Farmacologia e Toxicologia da Universidade de León pela Dra. Rosa Maria Regueira e equipe (Calvo-Álvarez et al., 2015) e gentilmente cedidas para a realização desta pesquisa.

2.3.1. Manutenção de parasitos

Para manutenção dos parasitos, um cultivo de 10 mL em fase logarítmica com 30x10⁶ de formas promastigotas/mL foi submetido à centrifugação de 1,6 g durante 10 minutos. O *pellet* foi ressuspenso em 1 mL de meio M199 suplementado com 10% de DMSO, 5% de SFB em ausência de tampão hepes

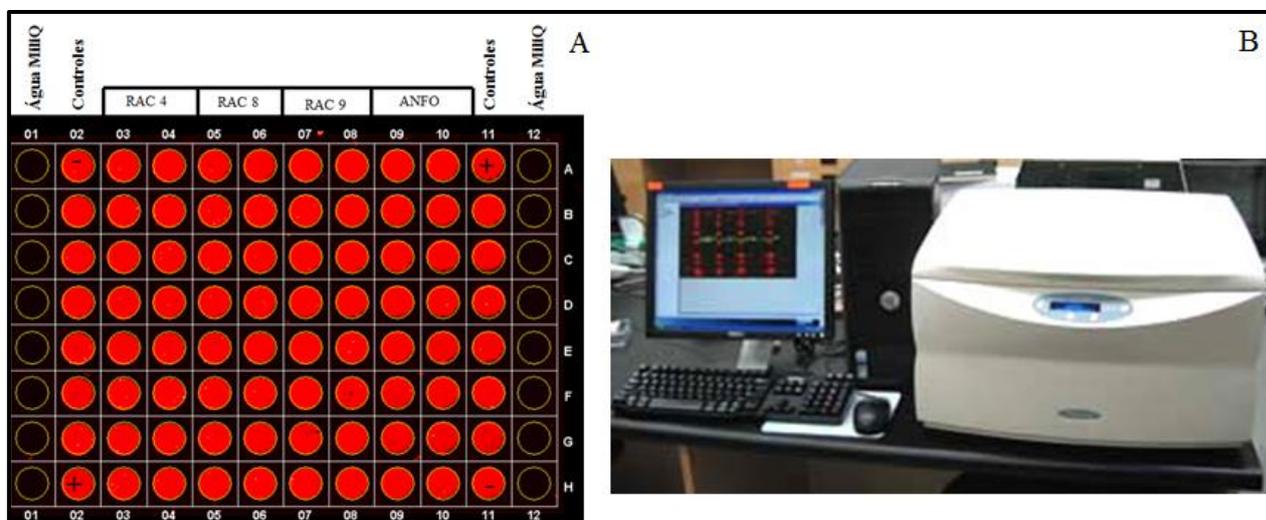
e antibiótico. Uma concentração de 10^8 células/mL foi transferida para crio tubos e congeladas em N_2 líquido até sua utilização.

Quando recrutadas para os ensaios, as formas promastigotas, foram ressuspensas em 10 mL de meio M199 e submetidas à centrifugação de 1600 g por 10 minutos. O *pellet* de células foi ressuspenso em meio M199 suplementado com 10% de SFB (v/v), 100 U de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina. O cultivo celular foi incubado a 26 °C e sua manutenção foi realizada a cada três dias.

2.3.2 Ensaio de atividade leishmanicida sobre formas promastigotas de *L. infantum* iFRP70.

Para investigar o efeito leishmanicida das substâncias RAC 1-16 foram utilizadas promastigotas em fase exponencial de *L. infantum* iFRP70 cultivadas em uma concentração de 10^6 células/mL. Em placas de 96 poços negras de fundo transparentes, foram adicionados 100 μ L de cultivo celular e 100 μ L de substância, em concentrações variando de 100 – 0,09 μ g/mL, em cada poço. Como controle negativo foi utilizado DMSO 0,1% e como controle positivo foi utilizado o fármaco padrão Anfotericina B (20 mM). As células também foram expostas ao fármaco padrão em concentrações iguais as das substâncias tratamentos (100 – 0,09 μ M). Os ensaios foram realizados em duplicatas (Figura 41-A). A placa foi incubada a 26 °C e a leitura do sinal infravermelho, presente unicamente nas células viáveis, foi avaliado entre os intervalos de 0 – 48 horas, através do equipamento de captação de imagem ODYSSEY® (Figura 41-B).

Figura 41 –Distribuição das substâncias RAC e dos controles, em placas de 96 poços negras para realização do ensaio atividade leishmanicidas sobre formas promastigotas de *L. Infantum* iRFP70 (A) e dispositivo para captação de imagem ODYSSEY® (B).



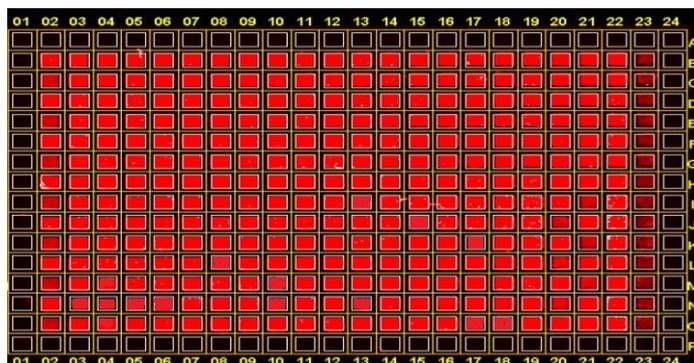
2.3.3 Ensaio de atividade leishmanicida sobre formas amastigotas de *L. infantum* iFRP70.

Para a realização deste ensaio foram usados camundongos BALB/c de 8 a 10 semanas de idade, adquiridos junto ao Harlan Laboratórios Ibérica e foram seguidos todos os protocolos necessários para experimentos com animais, conforme o parecer do comitê de ética da Universidade de León (Anexo 1).

Os animais foram sacrificados por deslocamento de cervical e os baços foram extraídos em condições assépticas. Em seguida, os baços foram dilacerados e suavemente passados por uma tãmise de 100 μm (Fisherbrand®) para obtenção de uma suspensão celular, a qual foi lavada com tampão PBS e centrifugada a 500g durante 15 minutos a 4 °C. Os esplenócitos recuperados foram ressuspensos em meio RPMI suplementado com SFB a 10% (v/v). A contagem de células foi realizada em câmara de Neubauer (TIUMAN et al., 2005). Em seguida, 6×10^5 células/poço foram semeadas em placas de 96 poços, as quais foram mantidas a 37 °C e uma atmosfera de 5% de CO₂ durante todo experimento.

Para avaliar a atividade leishmanicida das substâncias RAC sobre as formas amastigotas, foram utilizadas placas negras de fundo transparente com 384 poços (Figura 42). Em cada poço foi adicionado 40 µL do extrato celular de esplenócitos infectados com *L. infantum* iFRP70, e 40 µL de cada tratamento, em concentrações variando de 100-0,1 µM, com três repetições para cada tratamento. A placa foi incubada a 37 °C e as leituras do sinal infravermelho foram realizadas entre os intervalos de 0 – 48 horas, em ODYSSEY®. Anfotericina B, na concentração de 20 mM, foi utilizada como controle positivo.

Figura 42 – Imagem de uma placa de 384 poços registrada pelo dispositivo ODYSSEY®

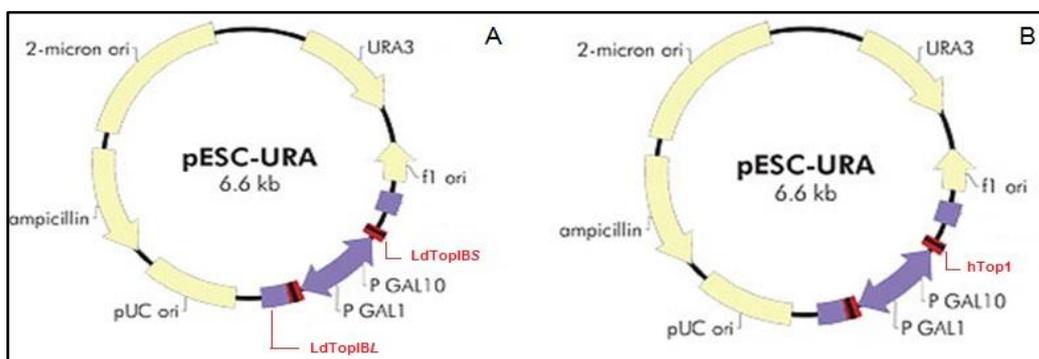


2.4. Ensaio moleculares com as enzimas topoisomerasas recombinantes de *Leishmania donovani* e humana

2.4.1. Amplificação das proteínas topoisomerase recombinante de *L. donovani* (sequências LdTopIBL e LdTopIBS) e topoisomerase humana (sequência hTop1)

O grupo de pesquisa da Universidade de León possui em seu banco de plasmídeo, o plasmídeo pESC-Ura GAL, que está especificamente desenhado para expressão de genes eucariotos em *Saccharomyces cerevisiae*. Deste modo foi possível obter na plasmideoteca do INTOXI-LEON, os plasmídeo pESC-Ura GAL com as sequências LdTopIBL e LdTopIBS (Figura 43-A) e com a sequência hTop1 (Figura 43-B). Esses plasmídeos foram utilizados nos processos de amplificação para obtenção das enzimas recombinantes LdTopIB e hTop1 em larga escala.

Figura 43 – Plasmídeo pESC-Ura com a inserção das subunidades LdTopL e LdTopS (A) e subunidade hTop1 (B)



O processo de amplificação aplicado para obtenção das enzimas LdTopIB e hTop1, foi o mesmo, sendo a principal diferença o tipo de cepa de *S. cerevisiae* utilizada para expressão final, onde a cepa *S. cerevisiae* EKY3 foi utilizada para expressar LdTopIB e a cepa *S. cerevisiae* MBY3 foi utilizada para expressar hTop1. Todos os ensaios realizados para obtenção das topoisomerases de leishmania e humana, foram realizados de forma independente.

A amplificação das sequências de topoisomerases desejadas, foi realizada através do Processo de Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), usando o termociclador MasterCicle gradient de Eppendorf programado para realizar 20 ciclos de amplificação a 72 °C por 10 minutos, realizando 1 minuto de desnaturalização a 95 °C, 1 minuto de hibridização a 66 °C e 1 minuto de alongação a 72 °C.

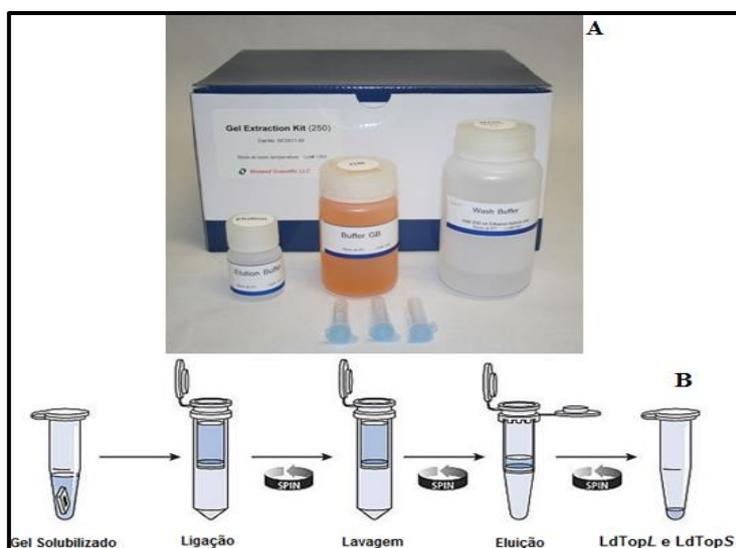
Para iniciar o processo de amplificação foi preparada uma solução contendo 20 ng de plasmídeo pESC-Ura, 120 ng de oligonucleotídeos (primers específicos para reconhecimento das subunidades e iniciadores do processo de amplificação) e 0,1 MM de uma mistura contendo nucleotídeos, 5 µL de tampão 10X para polimerase e 1 µL de enzima polimerase. Ao final da PCR as sequências amplificadas foram submetidas aos processos de confirmação e extração.

Para confirmar a amplificação, 2 µL de tampão de parada foi adicionado na solução resultante da PCR, e esta foi submetida a uma eletroforese em gel de agarose 0,7% (p/v) por 16 h a 400 V em tampão Tris-acetato-EDTA (TAE 1X). Transcorrido esse intervalo de tempo, o gel de agarose foi revelado com 10 µL

de Brometo de Etídeo (EtBr) e fotografado para identificação das bandas representativas das sequências de LdTopIB e hTop1

Após a identificação das bandas representativas das sequências de LdTopIB e hTop1, essas foram cortadas e submetidas a um processo de extração. Para isso foi utilizado o kit comercial QIAquick™ Gel Extraction Kit (Qiagen) (Figura 44-A), cuja metodologia é baseada na ligação seletiva das bandas representativas das sequências desejadas a uma membrana de sílica gel que preenche uma micro-coluna. A adsorção das sequências, na membrana de sílica gel, é realizada em presença de uma alta concentração de sais. O processo seguinte foi realizado conforme recomendação do fabricante. Para isso, foram utilizados os tampões que compõem o kit de extração, esses tampões foram adicionados nessa microcoluna e à medida que passavam pela sílica gel eliminavam as impurezas; e por fim, as sequências de LdTopIB e hTop1 foram desprendidas da sílica utilizando 50 µL de uma solução de Tris-HCl 10 mM pH 8,0 (Figura 44-B).

Figura 44 – Kit QIAquick™ para extração de DNA. (A) embalagem do Gel Extraction Kit. (B) Sequencia do método de extração de DNA, conforme recomendação do fabricante.



Fonte: (PRADA et al., *PlosOne*, v.8, 2013c).

Após a purificação das sequências, foi realizada a etapa de digestão, com o objetivo de promover a inserção dessas sequências nos vetores apropriados.

A ligação dos fragmentos amplificados foi realizada inicialmente no vetor intermediário (*Escherichia coli*) e depois no vetor final a levedura EKY3 (para LdTop1B) e MBY3 (para hTop1). Uma mistura contendo *E. coli*, fragmentos amplificados, tampão e água Mili-Q foi incubada em estufa bacteriológica por 16 horas a 16 °C, após esse período a mistura foi cultivada em placas de Petri contendo meio LB, essas placas foram incubadas por 24 horas a 37 °C, para crescimento bacteriano. Transcorrido o período de 24 horas, a ligação dos fragmentos das sequências no plasmídeo intermediário, foi confirmada através coloração apresentada pelas colônias bacterianas crescidas. Deste modo, a ligação foi confirmada pela coloração branca das colônias; enquanto a ausência de ligação foi confirmada pela coloração azul (Figura 45).

Figura 45– Modo de confirmação da ligação dos fragmentos das sequências de Top1B recombinantes no plasmídeo intermediário (*E. Coli*). Colônias com coloração branca correspondem a inserção positiva; colônias com coloração azul correspondem a inserção negativa.



Fonte: (PRADA et al., *PlosOne*, v.8, 2013c).

Uma vez confirmada a ligação dos fragmentos sequenciais no vetor intermediários, as colônias com coloração branca, foram submetidas a um processo de digestão, conforme as condições descritas anteriormente para esse processo. As sequências digeridas foram confirmadas através de gel de agarose e purificadas com auxílio do kit comercial QIAquick™ Gel Extraction Kit (Qiagen). Uma vez purificada essas sequências foram colocadas em contato com o vetor

final EKY3 para (LdTopIB) e MBY3 (para hTop1), através de uma mistura com 100 ng de fragmentos, 30 μ L de levedura, 8 μ L de esperma de salmão e 130 μ L de uma mistura contendo 8 mL de PEG 50%, 1 mL TE 10X e 1 mL de LiOAc 10X; e submetida a uma temperatura de 42 °C por 15 minutos. Após esse período a mistura foi semeada em placas de Petri contendo meio SCUra- e incubada a 30 °C por 48 horas para promover o crescimento da levedura. Através de um gel de agarose foi feita a confirmação das inserções dos fragmentos nas leveduras e por fim as leveduras com os insertos foram submetidas a um processo de purificação.

2.4.2. Sobre-expressão e purificação da enzima TopIB

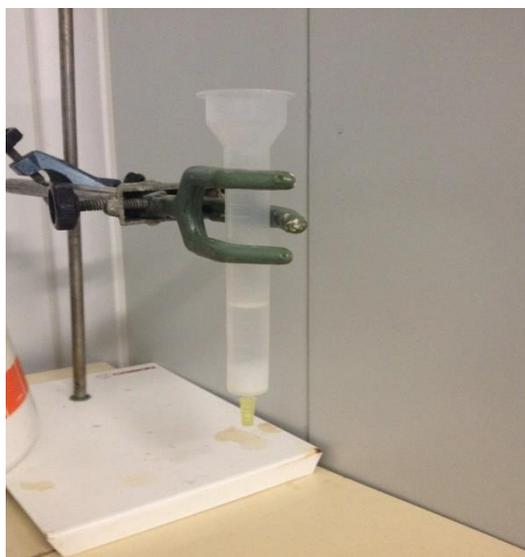
Após a confirmação das inserções dos fragmentos de LdTopIB e hTop1, nas respectivas leveduras, as colônias crescidas em placas contendo meio SCUra-, foram coletadas e transferidas para um Erlenmeyer de 50 mL contendo 10 mL de meio líquido SCUra- suplementado com glucose 2%. O pré-inóculo foi incubado a 30 °C O/N a 150 *rpm*. Transcorrido esse período, 8 mL desse pré-inóculo foram retirados e transferidos para um Erlenmeyer de 500 mL contendo meio Ura- suplementado com glucose 2% e incubado a 37 °C a 150 *rpm*. A partir de então, a cada 2 horas foi realizada a medida da densidade óptica do inóculo, quando a densidade óptica chegou a 0,8 foi adicionado 50 mL de galactose, para induzir o crescimento da levedura, e após 12 horas de incubação a 37 °C e 150 *rpm*, foi realizada a obtenção do extrato de levedura. Para isso, o inóculo foi submetido a uma centrifugação de 4000 *rpm* por 20 minutos a 4 °C. O *pellet* foi ressuspenso em tampão TEEG 1X 0,2 KCl suplementado com PMSF (100 μ M) e DTT (10 μ M) e submetido a centrifugação sob as mesmas condições descritas anteriormente. Após esse processo o sobrenadante foi descartado e o *pellet* contendo a levedura expressando as sequências de LdTopIB e hTop1 foi submetido ao processo de purificação mediante um sistema de cromatografia líquida em coluna preenchida pela resina Heparina Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare®), para obtenção das topoisomerase de leishmania e humana (Figura 46).

Para realizar a purificação o *pellet* foi ressuspenso em 10 mL de tampão TEEG 1X 0,2 KCL suplementado com PMSF e DTT e foi acrescido 5 ml de bolas

de vidro (GLASS BEAD, BioSpect), em seguida foi realizado um ciclo de lise celular de 30 min, no qual cada minuto foi alternado em 30 s de agitação em vortex e 30 s de repouso em gelo. Ao final do ciclo de lise, a mistura foi submetida à centrifugação de 10.000 *rpm* durante 30 minutos a -4 °C.

Antes de iniciar o processo de purificação, a coluna foi equilibrada inicialmente com 10 mL do tampão TEEG 1X 1KCl suplementado com PMSF (100 µM) e DTT (10 µM), seguido de 20 mL de TEEG 1X 0,2 KCl e 10 mL de TEEG 1X 0,4 KCl, suplementados com PMSF e DTT.

Figura 46 – Coluna cromatográfica preenchida com a resina Heparina Sepharose 6 Fast Flow (GE Healthcare®), usada para purificação de TopIB recombinante.



Fonte: autora (2016).

Uma vez equilibrada a coluna, o extrato de levedura obtido a partir do sobrenadante, foi suplementado com PMSF e DTT, a mistura foi filtrada, inicialmente em filtro de 0,65 µm e depois em filtro de 0,45 µm, aproximadamente 15 mL do filtrado foi adicionado na coluna para purificação.

O processo de purificação das enzimas recombinante é realizado a partir de uma cromatografia por afinidade, no qual o extrato de levedura contendo a enzima recombinante fica retido na resina heparina sepharose, cujo desprendimento acontece de acordo com a ordem descrita: após a filtração, os

15 mL de extrato de levedura são adicionados na coluna e submetido a eluição por força gravitacional. Quando completada a eluição do extrato de levedura, 10 mL de tampão TEEG 1X 0,2M KCl foi adicionado na coluna, com objetivo de arrastar todas as proteínas presentes na amostra. Em seguida, foi adicionado 4 mL de tampão 0,4 M KCl, usado para arrastar as endonucleases (enzimas de restrição que cortam o DNA). Por fim, se o a coluna continha extrato de levedura com expressão de LdTopIB, foi adicionado 10 mL de tampão TEEG 1X 0,6 KCl suplementado com DTT e PMSF, e o material eluído foi coletado em Eppendorff, sendo coletado 1 mL por Eppendorff, totalizando ao final 10 frações de LdTopIB. Se a coluna continha extrato de levedura com expressão de hTop1, foi adicionado 10 mL de tampão TEEG 1X 0,8 KCl suplementado com DTT e PMSF, e o material eluído foi coletado em Eppendorff, totalizando ao final 10 frações de hTop1.

2.4.3. Avaliação da atividade enzimática das topoisomerases recombinantes LdTopIB e hTop1 para confirmação de purificação da enzima.

Para confirmar a purificação das enzimas LdTopIB e hTop1, foi realizado um ensaio para verificar a atividade enzimática nas frações oriundas da purificação.

O ensaio de determinação da atividade de TopIB foi realizado de acordo com a metodologia descrita por Prada et al. (2013a). Inicialmente foi preparada uma mistura, com volume final de 20 μ L, a qual foi chamada de MIX e continha 2 μ L de tampão TOP10X, 0,5 μ g de DNA superenovelado circular (pSK), 12,5 de H₂O Milli-Q. A esta mistura foram adicionados 5 μ L de enzima purificada. A reação foi incubada durante 30 minutos a 37 °C. Após esse período a reação foi parada com 4 μ L de tampão de parada. As reações foram realizadas de forma independente para cada enzima recombinante (LdTopIB e hTop1) e para cada fração purificada. Como controle foi utilizado uma mistura com 15 μ L de Mix e 5 μ L de tampão TEEG 1x 0,6 M KCl. Após o período de incubação, as misturas foram submetidas a uma eletroforese em gel de agarose a 1% (p/v), preparada em 200 mL de tampão TBE 1X. A eletroforese foi realizada a 25 V durante 16 horas. O gel foi revelado com EtBr (0,5 μ g/100 mL), para obtenção de imagens

digitais usando um sistema de aquisição de imagens com transluminador de luz ultravioleta integrado (Sistema G-BOX, Syngene, UK).

2.4.4. Quantificação das atividades enzimáticas das topoisomerases recombinantes LdTopIB e hTop1.

A partir dos resultados obtidos no ensaio de atividade da enzima topoisomerase recombinante, as frações consideradas positivas para a presença de topoisomerase foram submetidas ao ensaio de quantificação da enzima. Para isso, inicialmente cada fração positiva, foi diluída na proporção 1:3, sendo realizada até quatro diluições. Separadamente, em eppendoffs de 2 mL, foram misturados 5 μ L de cada diluição com 15 μ L de MIX; além de 5 μ L da fração positiva sem dilui. As misturas foram submetidas à incubação por 30 minutos a 37 °C. Em seguida, as reações foram paradas como 4 μ L de tampão de parada e submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1% a 25 V durante 16 horas. A revelação do gel foi feita como 10 μ L de EtBr e a imagem obtida a partir do sistema G-BOX. Este ensaio é realizado para determinar a unidade enzimática (1U) que será utilizada nos ensaios de inibição.

2.4.5. Inibição das atividades das enzimas topoisomerases recombinantes LdTopIB e hTop1.

Para comprovar o possível efeito inibitório das substâncias RAC sobre a atividade de relaxamento da TopIB foram realizados ensaios a uma concentração fixa (100 μ M) em tempos diferentes (1, 5 e 30 minutos) e ensaios de concentrações diferentes (100 – 50 – 25 – 12,5 – 6,25 – 3,15 μ M) a um tempo fixo, dependente do resultado do ensaio a uma concentração fixa. Para realizar estes ensaios, 5 μ L de LdTopIB ou hTop1 foi misturado com e 2 μ L de substância a ser testada a uma concentração fixa de 100 μ M. A mistura foi incubada em gelo por 15 minutos. Em seguida, foi adicionado 2 μ L de tampão TOP10X, 0,5 μ g de DNA pSK e 10,5 μ L de H₂O Milli-Q ($V_f = 20 \mu$ L). As reações foram incubadas a 37 °C em intervalos de tempo de 1, 5 e 30 minutos. Ao término de cada intervalo de tempo, 4 μ L de tampão de parada foi adicionado e as reações foram submetidas a eletroforese em gel de agarose a 1% a 25 V durante 16

horas. A revelação do gel foi feita como 10 μ L de EtBr e a imagem obtida a partir do sistema G-BOX.

Com os resultados do ensaio de concentração fixa dependentes de diferentes intervalos de tempo, foi investigada a inibição da atividade de TopIB quando tratadas com diferentes concentrações das substâncias RAC. Para isso, as reações foram preparadas com 2 μ L de tampão TOP10X, 0,5 μ g de DNA pSK, 10,5 μ L de H₂O Milli-Q, 5 μ L de LdTopIB ou hTop1 e 2 μ L de substância em concentrações decrescentes de 100 – 3,15 μ M. Por fim, o gel foi revelado conforme as condições descritas anteriormente.

2.4.6. Formação de complexos de clivagem pelas substâncias RAC nas enzimas recombinantes LdTopIB.

Para detectar a formação de complexo de clivagem foi utilizado como substrato o plasmídeo circular superenovelado psK. Inicialmente foram realizadas reações à concentração fixa em diferentes intervalos de tempos. Assim, 2 μ L de substância a ser testada a uma concentração fixa de 100 μ M foi incubada em gelo por 15 minutos com 5 μ L de LdTopIB. Em seguida foi adicionado 2 μ L de tampão TOP10X, 0,5 μ g de DNA pSK, 3,0 μ L de tampão TEEG 1X 0,6 M KCl e 10, 5 μ L de H₂O Mili-Q. A mistura foi incubada a 37 °C a 2, 4, 8, 16 e 30 minutos. Após o período de incubação a reação foi parada com a adição de 4 μ L de SDS 2,5%. Em seguida, 1 μ L de proteinase K foi adicionada a mistura e esta foi incubada a 37 °C por 2 horas. Transcorrido esse tempo 25 μ L de fenol-clorofórmio foi adicionado, para limpar a amostra, e em seguida as reações foram centrifugadas por 10 minutos a 13.000 rpm. Após a centrifugação 18 μ L da mistura foi retirado e misturado com 4 μ L de tampão de parada. As reações foram submetidas à eletroforese em gel de agarose a 1% em tampão TBE 1X suplementado com EtBr (40 pg/ μ L). A eletroforese foi realizada a 25 V durante 16 horas. A revelação do gel foi feita como 10 μ L de EtBr e a imagem obtida a partir do sistema G-BOX.

Após a determinação do tempo de formação do complexo de clivagem para cada substância, foi investigada a formação de CL em diferentes concentrações e a um tempo fixo. Deste modo, 2 μ L de substância a ser testada nas concentrações de 100, 50, 25, 12,5, 6,25 e 3,15 μ M foi misturada com 5 μ L

de 1 U de LdTopIB e incubada por 15 minutos em gelo. Após o período de incubação adicionado 2 µL de tampão TOP 10X, 0,5 µg de DNA pSK, 3,0 µL de tampão TEEG 1X 0,6 M KCl e 10,5 µL de H₂O Mili-Q. A mistura foi incubada a 37 °C por 30 minutos. Os procedimentos seguintes foram realizados como descrito no parágrafo anterior.

2.5. Análise estatística

O efeito leishmanicida das substâncias RAC foi determinado como a concentração necessária para reduzir a viabilidade celular a 50% do controle negativo (CI₅₀). Para determinar os níveis de significância entre os grupos experimentais e o controle, foram realizados os testes estatísticos de análise de variância (ANOVA) seguido do teste Dunnett, com o auxílio dos softwares GraphPad Prism versão 5.0. Os valores foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$ comparando ao grupo controle. Os ensaios foram realizados em triplicatas. As bandas do gel que representavam o DNA superenovelado foram analisadas usando o software GeneSnap/SynGene[®] para determinar o percentual de inibição. Os valores percentuais de cada banda foram utilizados para calcular a concentração necessária para produzir 50% de inibição da atividade da LdTopIB (CI₅₀) utilizando o software estatístico SigmaPlot versão 11.3 (Systat Software INC, UK).

3. Resultados e Discussão

3.3.1. Efeito da viabilidade celular em macrófago

Após 48 horas de incubação, das 16 substâncias RAC testadas, apenas três: RAC2, RAC6 e RAC13 apresentaram efeitos deletérios sobre os macrófagos J774, com citotoxicidade máxima de $52,10 \pm 1,0\%$, $54,61 \pm 0,9\%$ e $50,00 \pm 0,0\%$, respectivamente (Tabela 9). As demais substâncias testadas não foram tóxicas para estas células. A pentamidina afetou a viabilidade dos macrófagos J774, como evidenciado pelo ensaio de MTT, e apresentou citotoxicidade máxima de $92,6 \pm 0,9\%$ e $CL_{50} = 1,33 \pm 0,3 \mu\text{M}$.

Tabela 9 – Efeito das substâncias RAC 1-16 sobre a viabilidade celular de macrófagos da linhagem J774 no ensaio de MTT após 48 horas.

Substâncias	CL_{50}^a	Citotoxicidade Máxima (%) ^b	Citotoxicidade 10 μM (%) ^c
Pentamidina	$1,33 \pm 0,3 \mu\text{M}$	$92,65 \pm 0,9^{***}$	NT
RAC 1	> 100	NT	NT
RAC 2	$1,03 \pm 0,1 \mu\text{M}$	$52,10 \pm 1,0^{***}$	NT
RAC 3	> 100	NT	NT
RAC 4	> 100	NT	NT
RAC 5	> 100	T	NT
RAC 6	$1,80 \pm 0,2 \mu\text{M}$	$54,61 \pm 0,9^{***}$	NT
RAC 7	> 100	NT	NT
RAC 8	> 100	NT	NT
RAC 9	> 100	NT	NT
RAC 10	> 100	NT	NT
RAC 11	> 100	NT	NT
RAC 12	> 100	NT	NT
RAC 13	$1,00 \pm 0,0 \mu\text{M}$	$50,00 \pm 0,0^{***}$	$19,6 \pm 1,0^{***}$
RAC 14	> 100	NT	NT
RAC 15	> 100	NT	NT
RAC 16	> 100	NT	NT

Os resultados referem-se a: ^aConcentração Letal a 50% dos macrófagos (CL_{50}) calculada através de curvas concentração-resposta tóxica. ^bMédia \pm erro padrão da média da citotoxicidade máxima em triplicatas de um experimento representativo. ^cMédia \pm erro padrão da média da citotoxicidade na concentração de 10 μM em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de efeito máximo foram considerados significativos quando * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$ e *** $P < 0,001$ em relação ao grupo DMSO 0,1%; NT: substância não apresenta atividade letal significativa para os macrófagos nas concentrações de 100 e 10 μM em relação ao grupo DMSO.

As alcanidas são consideradas uma classe distinta de produtos naturais formados por ácidos alifáticos de cadeia linear, na maior parte insaturados com

várias aminas por uma ligação amida. O crescente interesse nestes compostos se deve aos diversos tipos de atividades biológicas que possui, de modo que este tipo de molécula pode apresentar respostas notáveis em células receptoras, tendo demonstrado eficácia como compostos medicinais (WU et al., 2008).

Pesquisas relatam a ausência de toxicidade de alcanidas frente a macrófagos, como por exemplo, a pesquisa de Cabanillas e colaboradores (2010) que observaram toxicidade moderada de alcanidas isoladas de *Piper sanguineispicum* em macrófagos; e a pesquisa de Sahi et al. (2012), que observaram baixa toxicidade de alcanidas isoladas de *Piper longum* frente a macrófagos da linhagem J774A1. Neste trabalho os dados obtidos apontam que as alcanidas testadas, com exceção das RAC2, RAC6 e RAC3, não afetaram a viabilidade celular de macrófagos J774, não sendo, portanto, tóxicas para células de mamíferos.

3.3.2. Efeitos leishmanicidas sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*.

Os resultados dos efeitos leishmanicidas das RAC 1-16 sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* foram registrados na Tabela 10; enquanto os efeitos sobre as formas promastigotas de *L. chagasi* foram registrados na Tabela 11. Todas as substâncias testadas foram ativas em formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* quando comparadas à pentamidina.

Os efeitos leishmanicidas de alcanidas já foram registrado por Althaus et al. (2014), que testaram alcanidas isoladas de *Achillea ptarmica* (Asteraceae) sobre formas promastigotas de *L. donovani* e observaram efeito leishmanicida moderado das substâncias pellitorine ($CI_{50}=5,96\pm 0,16$), 8,9-Z-Dehidropellitorine ($CI_{50}=5,01\pm 0,12$) e 2,4-undecadieno-8,10-dinóico ácidos isobutilamida ($CI_{50}=8,87\pm 1,33$); e por Garcia-Chavez et al. (2004), que relataram atividade leishmanicida de alcanidas, isoladas de espécies do gênero *Heliopsis* sp., frente a diferentes espécies de Leishmania.

Tabela 10 – Efeitos das substâncias RAC 1-16 sobre a viabilidade de formas promastigotas de *L. amazonensis* após 48 horas de tratamento.

Substâncias	<i>L. amazonensis</i>		
	CI ₅₀ (µM) ^a	Efeito Máximo (%) ^b	Efeito (10 µM) ^c
Pentamidina	2,7±0,9	98,0±0,2***	83,6±2,0***
RAC 1	0,6±0,3	88,8±0,3***	81,8±0,6***
RAC 2	0,4±0,1	77,6±0,9***	65,3±0,2***
RAC 3	0,4±0,0	78,2±0,8***	68,5±0,8***
RAC 4	0,6±0,5	66,8±1,1***	64,1±1,3***
RAC 5	0,3±0,1	86,1±0,1***	86,1±0,1***
RAC 6	0,4±0,3	81,2±2,7***	74,5±0,3***
RAC 7	0,2±0,1	86,1±0,1***	85,3±2,0***
RAC 8	4,2±0,5	63,6±1,0***	58,8±1,3***
RAC 9	2,4±0,1	73,3±1,0***	71,2±0,1***
RAC 10	4,2±0,9	74,0±0,8***	74,0±0,8***
RAC 11	3,8±0,5	62,9±1,0***	60,5±0,2***
RAC 12	5,1±1,2	54,2±1,0**	53,1±0,2**
RAC 13	0,7±0,1	97,2±1,0***	86,5±1,0**
RAC 14	1,0±0,2	63,2±2,0***	54,8±1,0**
RAC 15	5,4±1,7	55,0±2,0**	52,0±1,0**
RAC 16	5,9±0,5	53,6±1,0**	53,6±1,0**

Os resultados referem-se a: ^aConcentração inibitória a 50% das formas promastigotas (CI₅₀) calculada através de curvas concentração-resposta tóxica e expressa como média±erro padrão da média; ^bEfeito máximo (EM) que é expresso como média da toxicidade máxima ± erro padrão da média em triplicatas de um experimento representativo. ^cMédia ± erro padrão da média da citotoxicidade na concentração de 10 µM em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de efeito máximo foram considerados significativos quando *p < 0,05, **p < 0,01 e *** P<0,001 em relação ao grupo DMSO 0,1%; NA: substância não apresenta atividade letal significativa para promastigotas de *L. amazonensis* nas concentrações de 100 e 10 µM em relação ao grupo DMSO.

Tabela 11– Efeitos das substâncias RAC 1-16 sobre a viabilidade de formas promastigotas de *L. chagasi* após 48 horas de tratamento.

Substâncias	<i>L. chagasi</i>		
	CI ₅₀ (µM)	Efeito Máximo (%)	Efeito (10 µM)
Pentamidina	2,1±0,9	89,7±1,0***	80,2±2,0***
RAC 1	3,5±0,2	83,7±0,3***	76,1±0,6***
RAC 2	3,7±0,5	80,8±2,6***	63,7±1,0***
RAC 3	1,4±1,1	77,5±1,1***	69,2±1,8***
RAC 4	3,1±0,5	86,5±0,9***	85,3±0,5***
RAC 5	2,8±0,1	71,9±0,8***	70,7±1,0***
RAC 6	5,5±1,0	56,4±0,7**	56,4±0,7**
RAC 7	6,3±0,4	53,8±2,0**	53,8±2,0**
RAC 8	2,7±0,5	89,3±0,8***	74,5±1,0***
RAC 9	6,9±0,1	57,8±1,2**	51,4±1,0**
RAC 10	7,4±0,5	68,3±2,0**	53,3±1,2**
RAC 11	9,6±1,7	51,6±1,3**	51,6±1,3**
RAC 12	3,4±1,2	80,1±1,0***	68,7±2,0***
RAC 13	3,0±0,7	88,3±1,6***	75,5±0,5***
RAC 14	2,9±0,3	76,0±2,0***	59,2±0,6***
RAC 15	4,2±1,4	91,7±1,9***	68,1±1,0***
RAC 16	6,7±0,5	56,3±1,0**	56,3±1,0**

Os resultados referem-se a: ^aConcentração inibitória a 50% das formas promastigotas (CI₅₀) calculada através de curvas concentração-resposta tóxica e expressa como média±erro padrão da média; ^bEfeito máximo (EM) que é expresso como média da toxicidade máxima ± erro padrão da média em triplicatas de um experimento representativo. ^cMédia ± erro padrão da média da citotoxicidade na concentração de 10 µM em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de efeito máximo foram considerados significativos quando *p < 0,05, **p < 0,01 e *** P<0,001 em relação ao grupo DMSO 0,1%; NA: substância não apresenta atividade letal significativa para promastigotas de *L. chagasi* nas concentrações de 100 e 10 µM em relação ao grupo DMSO.

3.3.3. Efeitos leishmanicidas sobre formas amastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*.

Os resultados dos efeitos leishmanicidas das RAC 1-16 sobre as formas amastigotas de *L. amazonensis* foram registrados na Tabela 12. Os resultados dos efeitos leishmanicidas das RAC 1- 16 sobre as formas amastigotas de *L. chagasi* foram registrados na Tabela 13.

Tabela 12 – Efeitos das substâncias RAC 1-16 sobre a viabilidade de formas amastigotas de *L. amazonensis* após 48 horas de tratamento.

Substâncias	<i>L. amazonensis</i>	
	CI ₅₀ (µM) ^a	Efeito Máximo (%) ^b
Pentamidina	1,5±1,2	69,2±0,4***
RAC 1	>100	NA
RAC 2	6,0±0,5	57,1±1,9***
RAC 3	>100	NA
RAC 4	0,9±0,5	67,4±1,0***
RAC 5	1,0±0,5	61,5±0,5***
RAC 6	1,4±0,5	64,7±0,5***
RAC 7	1,2±0,5	60,4±0,3***
RAC 8	1,6±0,1	60,9±0,3***
RAC 9	2,9±0,8	59,0±1,0***
RAC 10	2,2±0,8	57,1±0,6***
RAC 11	3,2±1,0	57,3±1,2***
RAC 12	3,4±1,0	58,1±1,2***
RAC 13	2,2±1,0	58,3±1,2***
RAC 14	1,4±0,1	65,5±0,5***
RAC 15	>100	NA
RAC 16	1,4±0,8	64,7±1,0***

Os resultados referem-se a: ^aConcentração inibitória a 50% de formas amastigotas (CI₅₀) calculada através de curvas concentração-resposta tóxica e expressa como média±erro padrão da média; ^bEfeito máximo (EM) que é expresso como média da citotoxicidade máxima ± erro padrão da média em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de EM foram considerados significativos quando ***p < 0,01 em relação ao grupo DMSO 0,1%. NA: substância não apresentou atividade letal significativa para formas amastigotas de *L. amazonensis* até a máxima concentração de 10 µM em relação ao grupo DMSO.

Tabela 13 – Efeitos das substâncias RAC 1-16 sobre a viabilidade de formas amastigotas de *L. chagasi* após 48 horas de tratamento.

Substâncias	<i>L. chagasi</i>	
	CI ₅₀ (µM)	Efeito Máximo (%)
Pentamidina	3,8±0,5	71,6±0,8***
RAC 1	>100	NA
RAC 2	4,1±0,9	54,3±3,0***
RAC 3	>100	NA
RAC 4	9,3± 0,5	51,2±2,0***
RAC 5	9,0±1,3	60,0±1,5***
RAC 6	>100	NA
RAC 7	>100	NA
RAC 8	2,3±0,5	69,8±1,0***
RAC 9	4,8± 0,1	64,6±0,9***
RAC 10	>100	NA
RAC 11	>100	NA
RAC 12	2,5±0,5	69,3±0,4***
RAC 13	6,9±0,5	61,3±1,6***
RAC 14	>100	NA
RAC 15	>100	NA
RAC 16	6,7±0,5	59,9±1,0***

Os resultados referem-se a: ^aConcentração inibitória a 50% de formas amastigotas (CI₅₀) calculada através de curvas concentração-resposta tóxica e expressa como média±erro padrão da média; ^bEfeito máximo (EM) que é expresso como média da citotoxicidade máxima ± erro padrão da média em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de EM foram considerados significativos quando ***p < 0,01 em relação ao grupo DMSO 0,1%. NA: substância não apresentou atividade letal significativa para formas amastigotas de *L. chagasi* até a máxima concentração de 10 µM em relação ao grupo DMSO.

Os resultados obtidos apontam que as alcamidas usadas neste trabalho apresentaram efeitos leishmanicidas significativos sobre as espécies *L. amazonensis* e *L. chagasi*, com destaque para os efeitos sobre as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*. De modo geral, as substâncias RAC apresentaram atividade leishmanicida mais eficiente para a espécie *L. amazonensis*, e atividade moderada para a espécie *L. chagasi*; havendo, inclusive registro de atividade para a espécie *L. amazonensis* e ausência de atividade para a espécie *L. chagasi*, nos ensaios de viabilidade para formas amastigotas, como foi o caso de RAC6, RAC7, RAC10, RAC11, RAC14. Segundo Wilson e Pearson (1990), as diferentes espécies do gênero *Leishmania* produzem grande variedade de manifestações clínicas que dependem da interação entre a resposta imune do hospedeiro vertebrado e da invasividade, tropismo e patogenicidade deste parasita; o que

consequentemente permite aos fármacos e drogas atuarem de forma diferente frente às diferentes espécies de *Leishmania* (LAINSON, 2010).

As alcamidas testadas foram desenhadas como análogos do fármaco pentamidina, de modo que é possível observar percentuais de inibição do crescimento de formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* muito próximos aos resultados obtidos nos ensaios com o fármaco, por exemplo, RAC14 com 65,5% nos ensaios frente a formas amastigotas de *L. amazonensis*, enquanto a pentamidina apresentou 69,2%; e a RAC 12 com 69,3% nos ensaios com *L. chagasi*, enquanto a pentamidina apresentou 71,6%.

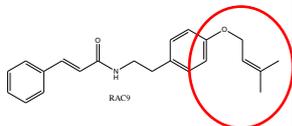
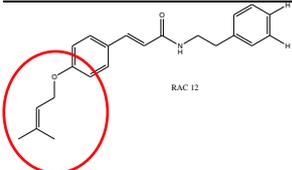
Algumas alcamidas foram testadas frente a formas amastigotas de leishmania, o estudo de Althaus et al. (2014), relata a atividade de pellitorina e 8,9-Z-Dehidropellitorine frente a formas amastigotas de *L. donovani*. Há poucos relatos da atividade leishmanicida de alcamidas, mas os registros de atividades biológicas, particularmente atividade antiparasitária, frente à *Plasmodium falciparum* (ROSS et al., 2005), *Trypanosoma brucei* e *Typanosoma cruzi* (ALTHAUS et al., 2014), aponta as substâncias desse grupo como um potencial a ser explorado.

A presença da amina nas substâncias RAC sugere que a atividade leishmanicida exercida por essas substâncias pode ser atribuída a esse grupo, Estudos como os de Carrara et al. (2013) mostraram que as amidas *N*-[7-(3',4'-methylenedioxyphenyl)-2(Z),4(Z)-heptadienoyl] pyrrolidine e *N*-[7-(3',4'-methylenedioxyphenyl)- 2(E),4(E)-heptadienoyl]pyrrolidine, foram ativas frente a formas amastigotas de *L. amazonensis*, com valores de $CI_{50} = 20,5 \mu M$ e $CI_{50} = 14,5 \mu M$, respectivamente, valores significativos quando comparados ao fármaco Pentamidina. Barea et al. (2013) testaram amidas derivadas de quinoxalina 1,4-di-*N*-óxido e observaram que um derivado de ciclo-hexilo ($CI_{50} = 2,5 \mu M$) mostrou a melhor atividade contra *L. amazonensis* e um derivado de 3-cloropropilo ($CI_{50} = 0,7 \mu M$) contra *L. infantum*. Bodiwala et al. (2007), registraram a atividade leishmanicida da amida poplartine, isolada de *Piper retrofractum*, em ensaios *in vitro* e *in vivo* com *L. donovani*.

Quando se faz uma análise considerando a relação estrutura-atividade das substâncias testadas, é possível observar que a mudança do radical é muito relevante para o efeito leishmanicida exercido. Tomando como exemplo as RAC 9 e RAC12 observa-se que o efeito máximo, em $10 \mu M$, da RAC 9 aumentou

para 59,0% em relação a um RAC12 (58,3%) sobre formas amastigotas de *L. amazonensis*; enquanto o efeito da RAC 12 aumentou para 71,3%, em relação a RAC 9 (64,6%) sobre formas amastigotas de *L. chagasi* (Tabela 14).

Tabela 14 – Diferenças no efeito leishmanicida exercido pelas substâncias RAC9 e RAC13 sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi*.

Substâncias	<i>L. amazonensis</i>				<i>L. chagasi</i>			
	Promastigotas		Amastigotas		Promastigotas		Amastigotas	
	CI ₅₀ (μM)	EM (%) ^a						
	2,4±01	71,2±0,1	2,9±0,8	59,1±1,0	6,9±1,0	51,4±1,2	4,8±0,1	64,6±0,9
	5,1±0,5	53,1±0,2	3,4±1,0	58,1±1,2	3,4±1,2	68,7±2,0	2,5±0,5	71,3±0,4

^aMédia ± erro padrão da média da citotoxicidade na concentração de 10 μM em triplicatas de um experimento representativo.

3.3.4. Efeitos leishmanicidas sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. infantum* iFRP70

A substâncias RAC também foram testadas frente a formas promastigotas de *L. infantum* marcada com a proteína infravermelha iRFP70, em ensaios *in vitro*; e em formas amastigotas em ensaios *ex vivo*. Os resultados destes ensaios estão disponíveis na Tabela 15.

As estirpes fluorescentes de *L. infantum* possuem a propriedade de sobre-expressar a proteína iRFP, essas cepas sofreram uma manipulação genômica que não afetam a taxa de crescimento dos parasitas, quando comparadas com promastigotas do tipo selvagem, entretanto, as estirpes fluorescentes

desenvolvem mecanismo de defesa mais eficientes, o que gera uma maior resistência à substâncias e/ou fármacos leishmanicidas, e como consequência, aumenta a sensibilidade dos ensaios de investigação de moléculas bioativas (CALVO-ALVAREZ et al., 2015).

Tabela 15 - Efeito das substâncias RAC 1-16 e da Anfotericina B sobre a viabilidade de formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania infantum* após 48 horas de tratamento.

<i>L. infantum</i> iFR70				
Substâncias	Promastigotas		Amastigotas	
	CI ₅₀ ^a	EM (%±DP) ^b	CI ₅₀ ^a	EM (%±DP) ^b
Anfotericina	0,9±0,2 µM	92,4±1,2*	0,8±0,1 µM	91,6±1,0*
RAC 1	>100	NA	>100	NA
RAC 2	>100	NA	>100	NA
RAC 3	7,8±1,0 µM	62,1±1,0*	>100	NA
RAC 4	1,7±0,3 µM	79,4±1,0*	5,0±0,5 µM	63,0±1,0*
RAC 5	6,9±1,5 µM	59,6±1,1*	8,0±0,5 µM	53,0±0,8*
RAC 6	>100	NA	>100	NA
RAC 7	36,1±1,0 µM	69,6±1,2*	56,2±1,0 µM	79,8±0,5*
RAC 8	3,0±0,5 µM	59,6±1,1*	18,8±0,2 µM	62,0±1,2*
RAC 9	13,4±2,0 µM	61,6±1,0*	21,0±1,0 µM	71,6±1,0*
RAC 10	>100	NA	>100	NA
RAC 11	>100	NA	>100	NA
RAC 12	25,3±2,0 µM	51,3±0,5*	13,4±1,8 µM	64,6±1,5*
RAC 13	19,3±1,3 µM	64,8±2,0*	>100	NA
RAC 14	>100	NA	>100	NA
RAC 15	>100	NA	>100	NA
RAC 16	18,6±0,5 µM	64,6±1,0*	19,6±1,0 µM	66,2±1,5*

Os resultados referem-se a: ^aConcentração inibitória a 50% (CI₅₀) calculada através de curvas concentração-resposta tóxica e expressa como média±erro padrão da média; ^bEfeito máximo que é expresso como média da toxicidade na concentração de 10 µM em triplicatas de um experimento representativo. Os valores de EM foram considerados significativos quando *p < 0,05 em relação ao grupo DMSO 0,1%. NA: substância não apresentou atividade letal significativa para promastigotas de *L. infantum* na concentração máxima de 100 µM em relação ao grupo DMSO.

De acordo com Noyes (1998), com a evolução das espécies de leishmania no Velho Mundo, foi possível observar o surgimento dos parasitas visceros trópicos *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum*; concomitantemente, a evolução deste mesmo parasita no Novo Mundo, produzindo o parasita visceroso trópico *L. chagasi*. Diante de estudos taxonômicos, foi possível classificar essas duas espécies em um só complexo taxonômico, que recebeu o nome de Complexo

Leishmania donovani, no qual se enquadram como espécies únicas *Leishmania donovani* Laveran & Mesnil, e *Leishmania infantum* Nicolle, com ocorrências no Velho Mundo; e *Leishmania chagasi* Cunha & Chagas, com ocorrência no Novo Mundo (LAINSON, 2010).

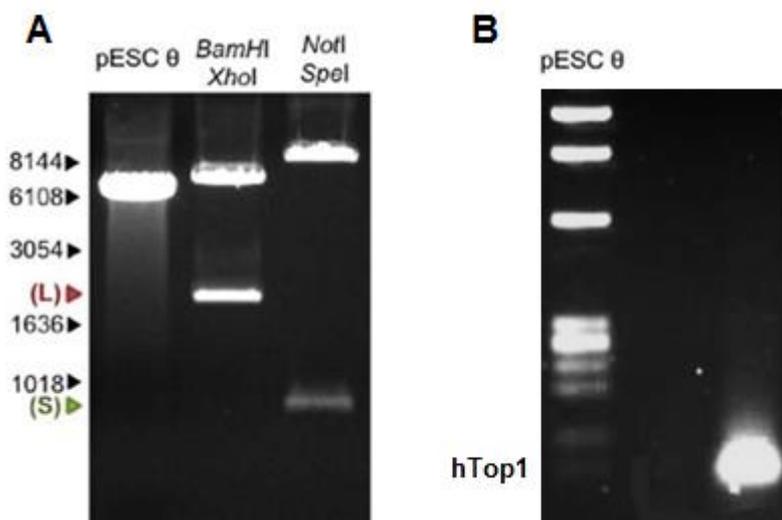
Neste estudo, quando se faz uma análise comparativa dos resultados do efeito leishmanicida das RAC1-16 nos ensaios realizados com as espécies *L. chagasi* e *L. infantum* iFRP70, é possível observar atividade moderada das substâncias para ambas espécies, como valores de CI₅₀ e efeitos máximo, menos efetivos para *L. infantum* iFRP70, o que pode ser justificado pela maior resistência das cepas iFRP70, em virtude da manipulação genômica, como afirma Calvo-Ávarez e colaboradores (2015).

Todos os resultados de atividade leishmanicida *in vitro* obtidos para as RAC 1-16 apontam essas substâncias como promissoras para tratamento das leishmanioses. Diante desses resultados, um passo inicial para uma comprovação efetiva, foi realizado com o objetivo de investigar o mecanismo de ação dessas substâncias, e para isso foi testada a ação destas sobre a atividade da enzima LdTopIB. Segundo Balaña-Fouce et al. (2014), a LdTopIB é um alvo promissor para o desenvolvimento de drogas leishmanicidas devido a duas razões principais: (i) a enzima tem uma expressão aumentada durante o ciclo de divisão celular e, especialmente (ii) LdTopIB é estruturalmente diferente da do hospedeiro mamífero.

3.3.5. Sobre-expressão e purificação da enzima TopIB.

Para sobre-expressar a LdTopIB foi usada uma porção digerida de DNA com o sequenciamento do gene *LdTopIL* que foi clonado sob o controle do promotor GAL 1 e o gene *LdTopIS* que foi clonado sob o controle do promotor GAL 10; como resultado foi construído o vetor pESCURA-LdTopIL-LdTopIS, que recebeu o nome de pESC-wt. O resultado da expressão dos genes *LdTopIL* e *LdTopIS*, por PCR, usando como molde o DNA genômico procedente de promastigotas de *L. donovani* e pESC-URA como vetor de expressão em levedura EKY3, está apresentado na Figura 47-A. O vetor pESC-URA também foi utilizado para expressar a enzima correspondente em mamíferos (hTop1) em leveduras MBY3 (Figura 47-B).

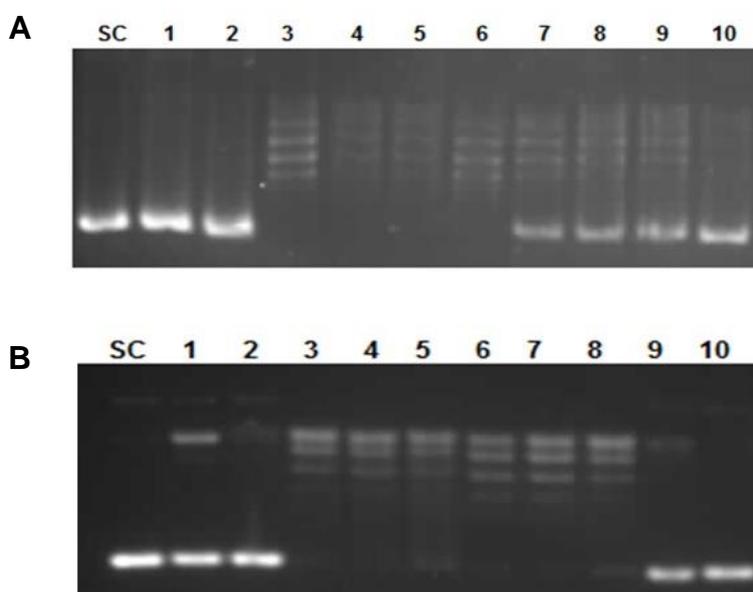
Figura 47 – Clonagem dos genes *LdTopIL* e *LdTopIS* e hTop1. (A) Gel de agarose mostrando os tamanhos obtidos para os produtos da digestão do vetor pESC-wt com os pares de enzimas *BamHI/XhoI* e *NotI/SpeI*, correspondentes aos genes *LdTopIL* e *LdTopIS*. (B) Gel de agarose mostrando os tamanhos obtidos para os produtos da digestão do vetor pESC-URA com o par correspondente ao gene hTop1.



A estrutura da Top1B de *Leishmania* spp. foi descrita por Villa e colaboradores (2003) e consiste em uma enzima funcional que possui duas subunidades de diferentes tamanhos: (a) *LdTopIL*, denominada de subunidade “large” (larga), com 636 aminoácidos, massa molecular teórica de 73 kDa e situado no cromossomo 34; e (b) *LdTopIS*, denominada de subunidade “small” (pequena), com 262 aminoácidos, massa molecular teórica de 28 kDa e situada no cromossomo 4 de *L. donovani*. De acordo com Alvares et al. (2015), essas subunidades se dobram e se associam ao citoplasma permitindo a formação do heterodímero com atividade Top1B.

Uma vez comprovado que os extratos das leveduras EKY3 transformadas com o vetor pESC-wt sobreexpressavam os dois genes de *LdTop1B*; e que os extratos de leveduras MBY3 sobreexpressavam os genes de hTop1, foi realizada a purificação para comprovação das frações mais ativas em ensaios de relaxamento de DNA superenovelado. Para *LdTop1B* as frações 3, 4, 5 e 6 foram as mais ativas (Figura 48-A) e para hTop1 as mais ativas foram as frações 3 – 8 (Figura 48-B).

Figura 48 – Comprovação da purificação das enzimas LdTopIB e hTop1 expressas em leveduras *S. cerevisiae* EKY3 e *S. cerevesae* MBY3, respectivamente. (A) Frações mais ativas de LdTopIB nos ensaios de relaxamento de DNA superenovelado. (B) Frações mais ativas de hTop1 nos ensaios de relaxamento de DNA superenovelado.

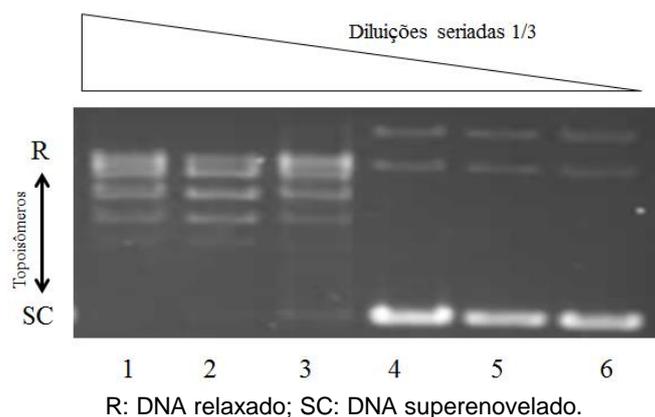


SC (DNA superenovelado); 1-10 (frações purificadas).

Com o objetivo de valorar a atividade de relaxamento da TopIB purificada, e assim estabelecer o conceito de Unidade enzimática ($U/\mu L$), foi realizado o ensaio de quantificação. Como critério geral se entende que o DNA está totalmente relaxado quando não se encontra presente no gel de agarose a banda correspondente ao DNA superenovelado. A partir dessa informação se estabelece a quantidade de enzima necessária ($U/\mu L$) para promover o relaxamento do DNA superenovelado.

A Figura 49 mostra o resultado do ensaio de quantificação das frações ativas, oriundas do ensaio de purificação, diluída na proporção 1/3 partindo de $0,5 \mu g$ da enzima concentrada. A partir do resultado foi possível normalizar todos os ensaios realizados com as diferentes TopIB recombinantes.

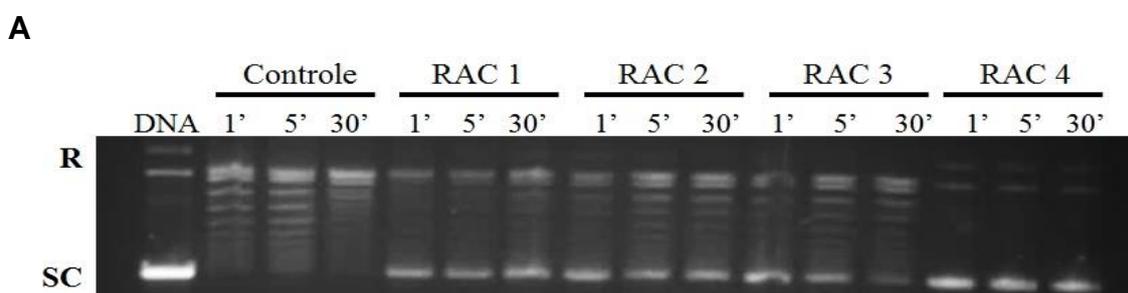
Figura 49 – Quantificação da atividade de relaxamento do DNA superenovelado mediante diluições seriadas 1/3.

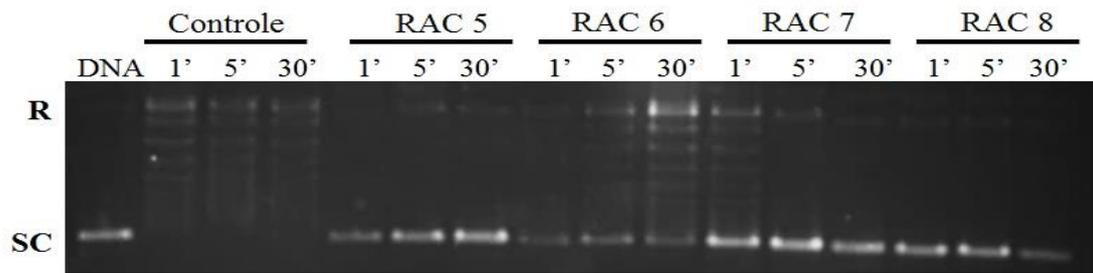
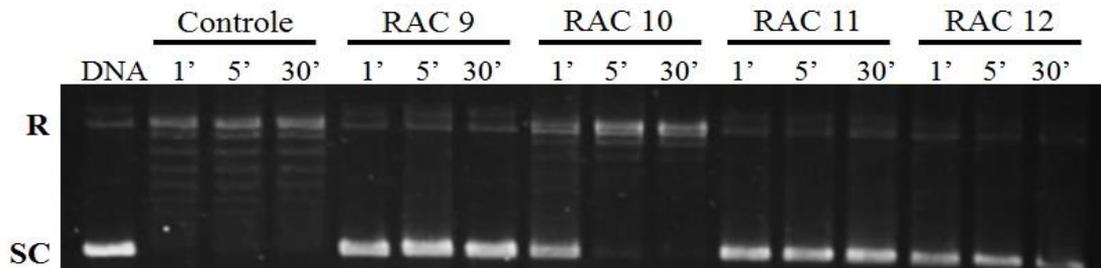
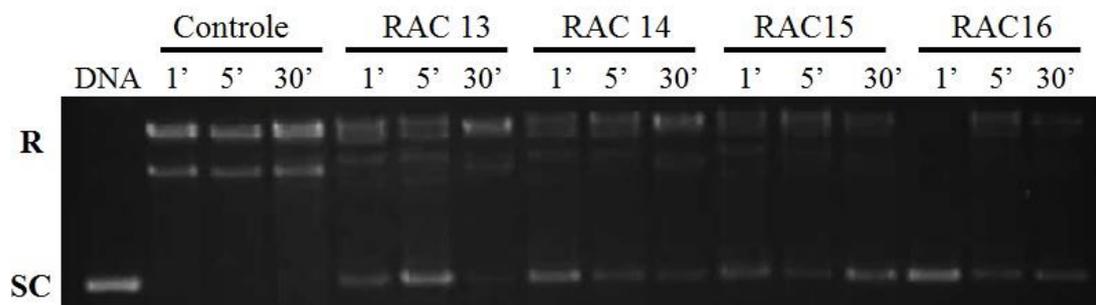


3.3.6. Inibição das atividades das enzimas topoisomerases recombinantes LdTopIB e hTop1.

Estabelecida a unidade enzimática (1U), foram realizados os ensaios para investigar os efeitos das RAC 1-16 sob a atividade da TopIB, através da capacidade enzimática em relaxar o DNA superenovelado. Os resultados do ensaio em função do tempo, utilizando uma concentração fixa (100 μ M), serviu, num primeiro momento, para comprovar se as substâncias eram capazes de inibir a atividade de LdTopIB (Figura 50) e hTop1 (Figura 51).

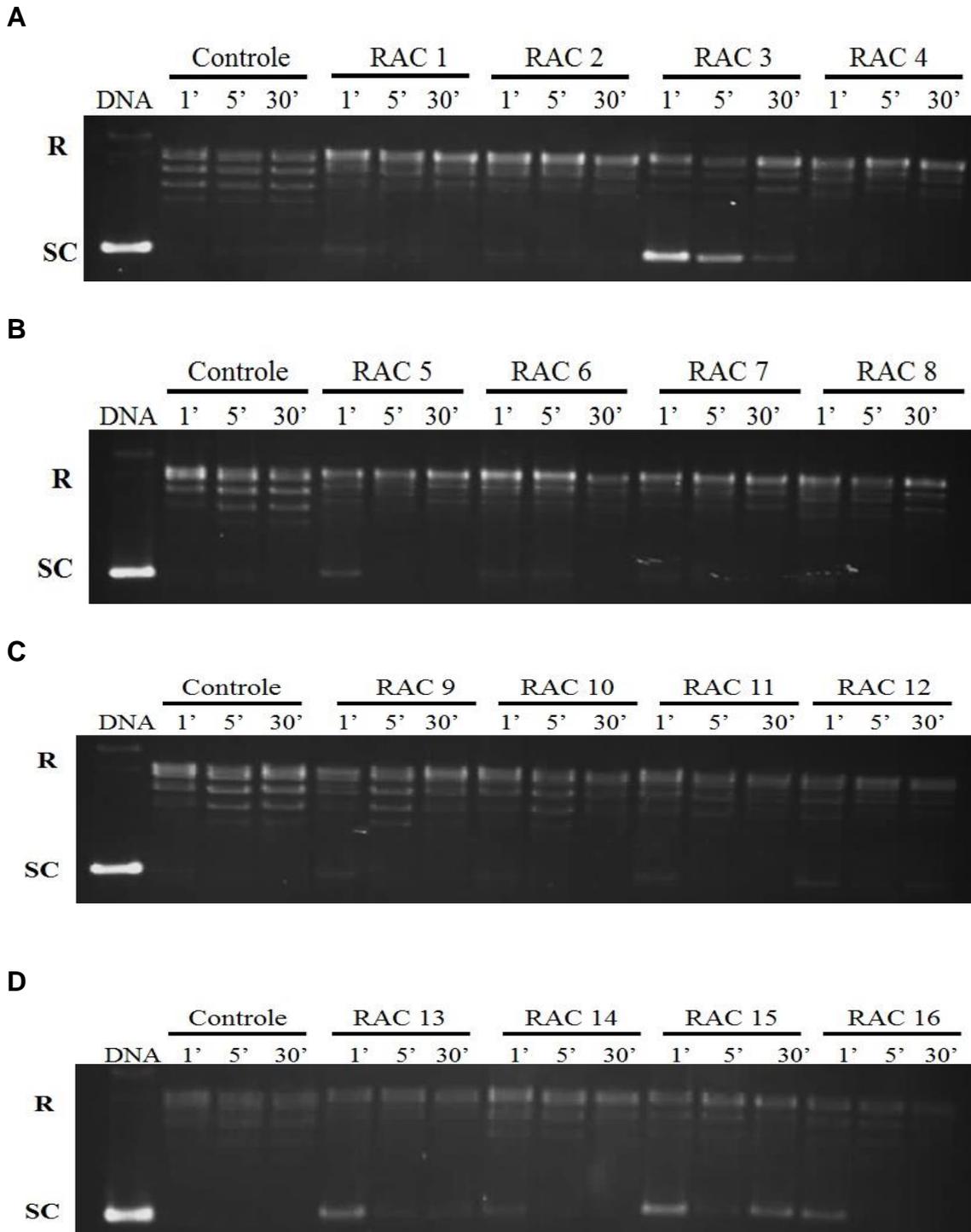
Figura 50 – Inibição da atividade de LdTopIB, mediante relaxamento do DNA superenovelado, pelas substâncias RAC 1-16 em presença de 1U de LdTopIB incubada com 100 μ M de cada substância e 0,5 μ g de plasmídeo psK em diferentes tempos (5, 10 e 30 minutos) a 37 °C. (A) RAC 1 – 4; (B) RAC 5 – 8; (C) RAC 9 – 12; (D) RAC 13 – 16.



B**C****D**

DNA (plasmídeo psK + DMSO 0,1%); Controle (1 U LdTopIB + plasmídeo psK + TOP10X); R (DNA relaxado); SC (DNA superenovelado).

Figura 51 – Inibição da atividade de hTop1 mediante relaxamento do DNA superenovelado, pelas substâncias RAC 1-16 em presença de 1U de LdTopIB incubada com 100 μ M de cada substância e 0,5 μ g de plasmídeo psK em diferentes tempos (5, 10 e 30 minutos) a 37 °C. (A) RAC 1 – 4; (B) RAC 5 – 8; (C) RAC 9 – 12; (D) RAC 13 – 16.



DNA (plasmídeo psK + DMSO 0,1%); Controle (1 U LdTopIB + plasmídeo psK + TOP10X); R (DNA relaxado); SC (DNA superenovelado); R (DNA relaxado); SC (DNA superenovelado).

Considerando os critérios de inibição de atividade da topoisomerase proposto por Tejería et al. (2016), os resultados de inibição de LdTopIB em função do tempo, apontam que as RAC4, RAC8, RAC9, RAC12, RAC13 e RAC16 inibiram totalmente a atividade enzimática; enquanto as demais substâncias apresentaram inibição similar ao controle sem enzima, em todos ou algum dos intervalos de tempo testados (Tabela 16).

Tabela 16 – Atividades inibidoras comparativas das substâncias RAC sobre LdTopIB e hTopIB em função do tempo^a.

Substâncias	LdTopIB Tempo (min)			hTop1 Tempo (min)		
	1	5	30	1	5	30
RAC 1	++	++	+	-	-	-
RAC 2	++	++	+	-	-	-
RAC 3	++	++	+	+	+	-
RAC 4	+++	+++	+++	-	-	-
RAC 5	+++	+++	++	+	-	-
RAC 6	+	+	+	-	-	-
RAC 7	++	+++	+++	-	-	-
RAC 8	+++	+++	+++	-	-	-
RAC 9	+++	+++	+++	-	-	-
RAC 10	+++	-	-	-	-	-
RAC 11	+++	+++	+++	-	-	-
RAC 12	+++	+++	+++	-	-	-
RAC 13	++	+++	+++	++	-	-
RAC 14	++	++	++	+	-	-
RAC 15	++	++	++	++	+	+
RAC 16	+++	++	++	-	-	-
Controle	-	-	-	-	-	-

^a 100 µM da substância foi pré-incubada com a enzima por 15 minutos, em seguida foi adicionado 0,5 µg de DNA superenovelado. Para o ensaio em função do tempo a inibição de TopIB foi expressa de forma semiquantitativa de acordo com o critério: +++ inibição total; ++ inibição similar ao controle sem enzima; - não inibido (Tejería et al., 2016). ^bNos ensaios com LdTopIB as reações dos controles foram realizadas com 0,5 µg de DNA superenovelado sem a presença da enzima topoisomerase e sem inibidor. ^cNos ensaios com hTopIB as reações dos controles foram realizadas com 0,5 µg de DNA superenovelado, 5 µg de hTopIB e 2 µg do inibidor camptotecina.

Embora das substâncias testadas apenas seis delas tenham apresentado inibição total da atividade de LdTopIB, é importante ressaltar que todas as substâncias testadas foram capazes de inibir a atividade enzimática. Em virtude disso, foi realizado o ensaio de inibição da atividade de LdTopIB e hTop1 em função da concentração das substâncias, com tempo de incubação conforme estabelecido no ensaio de tempo (Tabela 17).

Tabela 17 – Atividades inibidoras comparativas das substâncias RAC sobre LdTopIB e hTop1B em função da concentração^a.

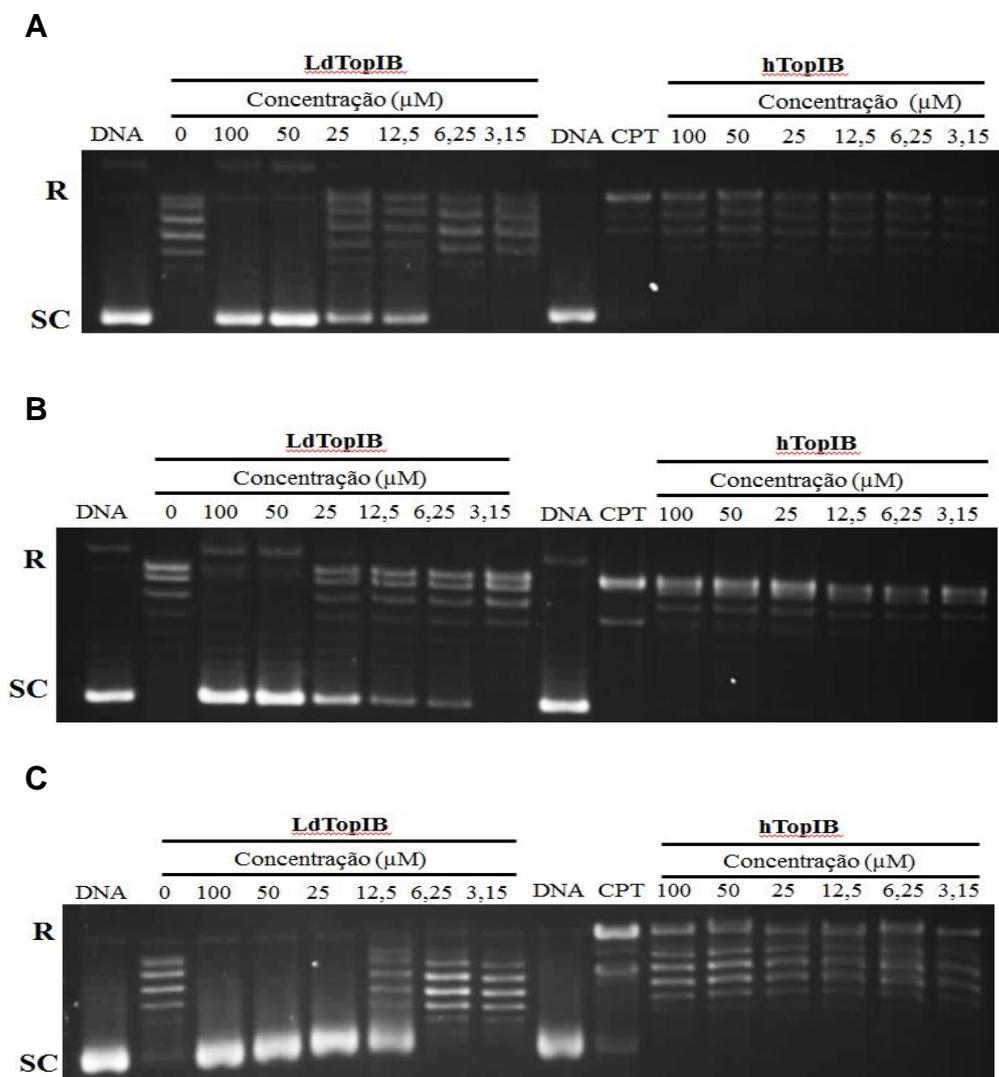
Substâncias	LdTopIB Concentração (µM)						hTop1 Concentração (µM)					
	100	50	25	12,5	6,25	3,25	100	50	25	12,5	6,25	3,25
RAC 1	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RAC 2	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RAC 3	-	-	-	-	-	-	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
RAC 4	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
RAC 5	+++	-	-	-	-	-	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
RAC 6	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RAC 7	+	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-
RAC 8	+++	+++	++	+	+	-	-	-	-	-	-	-
RAC 9	+++	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-
RAC 10	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RAC 11	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RAC 12	+++	+++	++	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RAC 13	+++	+++	+++	+++	-	-	++	-	-	-	-	-
RAC 14	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
RAC 15	+++	-	-	-	-	-	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a	n/a
RAC 16	+++	+++	+++	+++	-	-	-	-	-	-	-	-
Controle	+++	-	-	-	-	-	+++	-	-	-	-	-

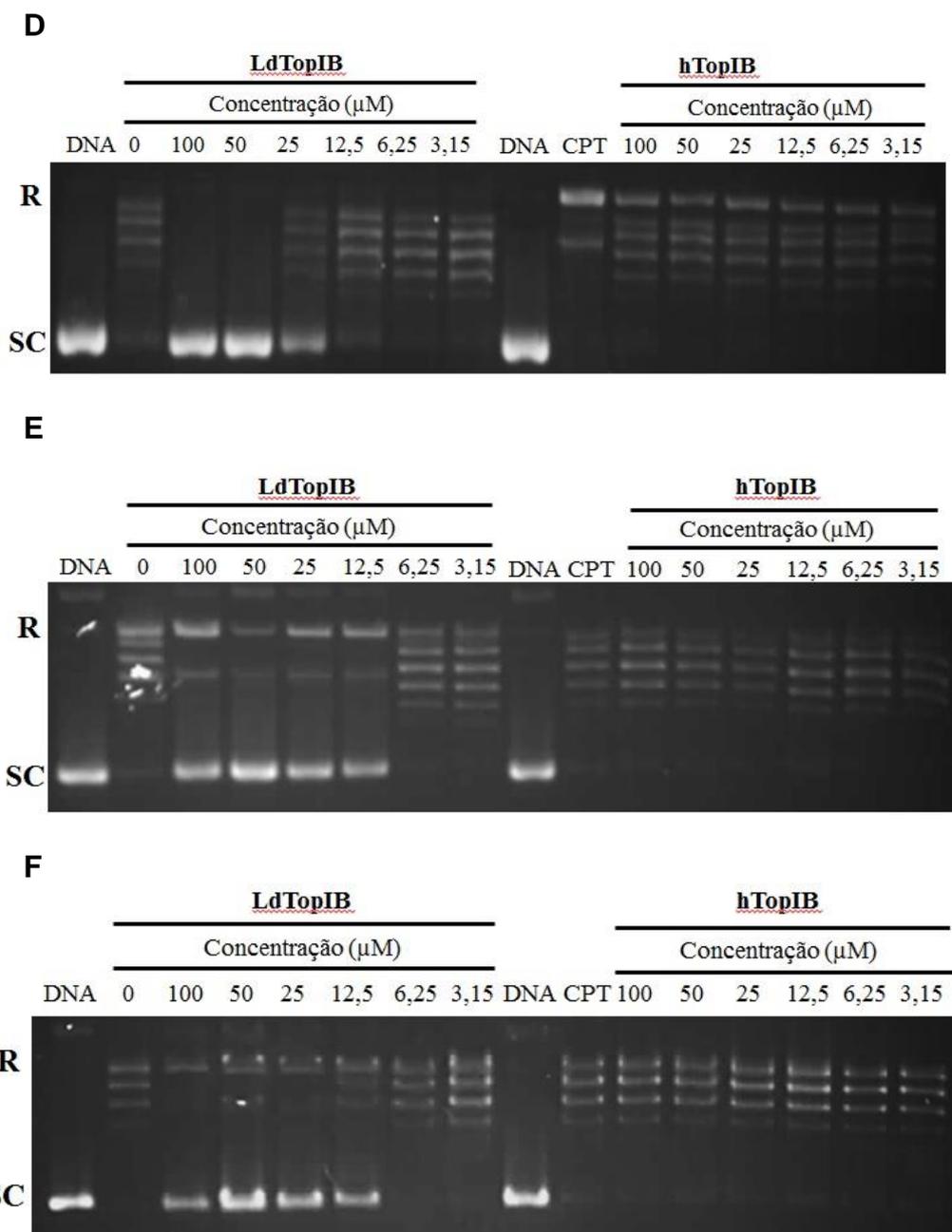
^a 100-0,1 µM da substância foi pré-incubada com a enzima por 15 minutos, em seguida foi adicionado 0,5 µg de DNA superenovelado. Para o ensaio em função da concentração a inibição de TopIB foi expressa de forma semiquantitativa de acordo com o critério: +++ inibição total; ++ inibição similar ao controle sem enzima; - não inibido (Tejería et al., 2016).

^bNos ensaios com LdTopIB as reações dos controles foram realizadas com 0,5 µg de DNA superenovelado sem a presença da enzima topoisomerase e sem inibidor. ^cNos ensaios com hTop1B as reações dos controles foram realizadas com 0,5 µg de DNA superenovelado, 5 µg de hTop1B e 2 µg do inibidor camptotecina.

O ensaio de inibição da atividade de LdTopIB confirmou a ação inibitória seletiva de algumas alcaloides testadas frente a atividade enzimática de LdTopIB, especialmente a excelente capacidade inibitória das RAC4, RAC8, RAC9, RAC12, RAC13 e RAC 16 (Figura 52). Estas mesmas substâncias não afetaram a atividade da hTop1.

Figura 52 – Inibição da atividade de LdTopIB e hTop1 mediante relaxamento do DNA superenovelado, pelas substâncias RAC4, RAC8, RAC9, RAC12, RAC13 e RAC16. em presença de 1U de LdTopIB incubada com diferentes concentrações de cada substância e 0,5 µg de plasmídeo psK em diferentes tempos a 37 °C. (A) RAC4; (B) RAC8; (C) RAC9; (D) RAC12; (E) RAC13 e (F) RAC16.

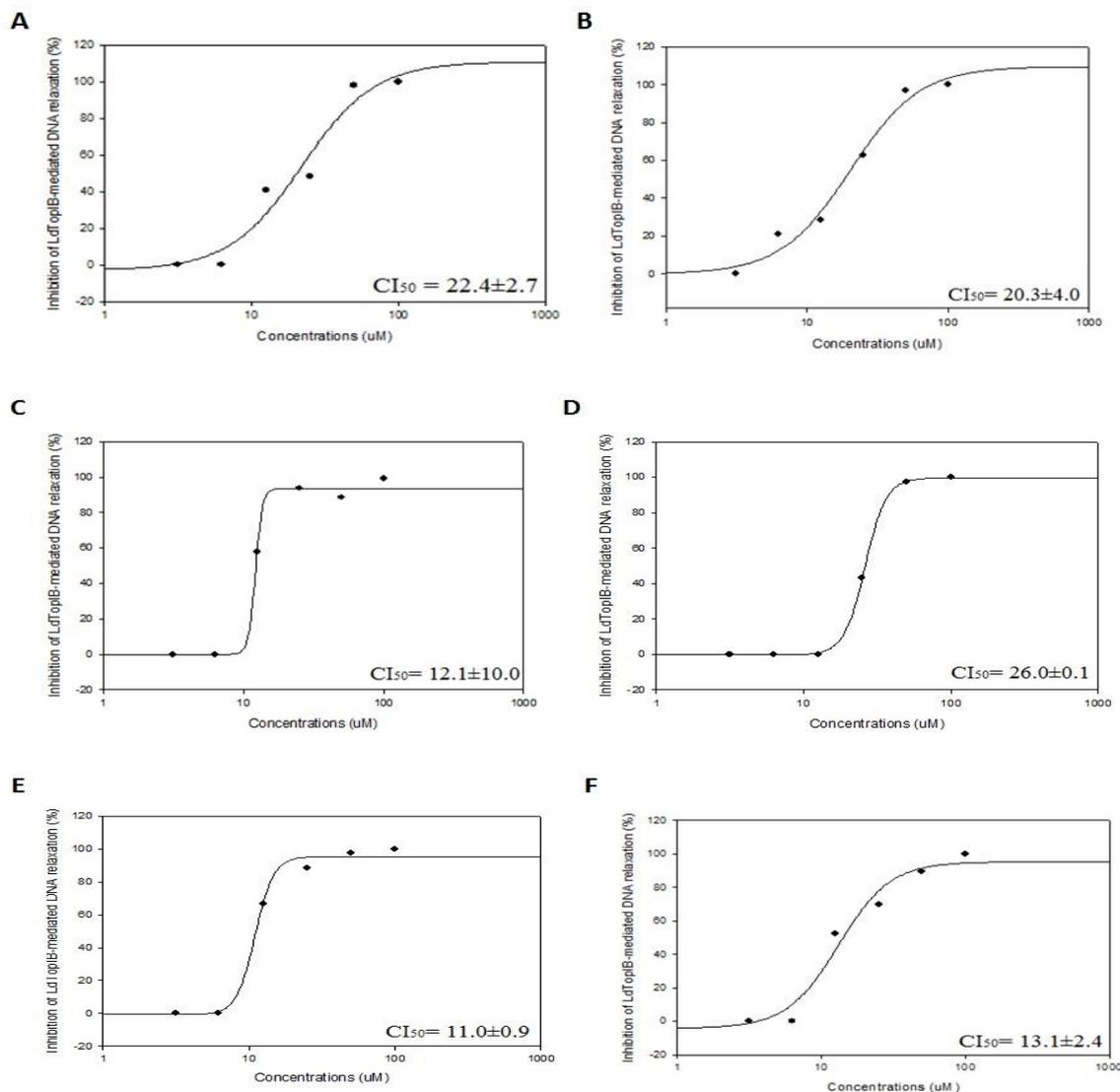




DNA (plasmídeo psK + DMSO 0,1%); 0 – 100 μM (plasmídeo + 1U topIB + substâncias); CPT (plasmídeo psK + camptotecina); R (DNA relaxado); SC (DNA superrenovado)

A partir do ensaio de inibição da atividade de LdTopIB e hTop1 foi possível calcular os percentuais de inibição e determinar a concentração inibitória mínima (CI_{50}), das substâncias que apresentaram inibição enzimática total, para tanto, foram consideradas as bandas de gel representativas do DNA superrenovado (Figura 53).

Figura 53 – Curva-dose resposta e determinação da concentração inibitória mínima (CI₅₀) do efeito inibitório das RAC4, RAC8, RAC9, RAC12, RAC13 e RAC16 sob a atividade da LdTopIB. (A) RAC4; (B) RAC8; (C) RAC9; (D) RAC12; (E) RAC13; (F) RAC16.



Segundo Nitiss et al. (2012), a topoisomerase I relaxa o DNA superenovelado na ausência de um co-fator de energia, permitindo a rotação da dupla hélice do DNA. Para isso, a TopIB corta uma das fitas de DNA, formando com a molécula de DNA uma ligação fosfodiéster covalente entre a tirosina catalítica e a extremidade 3' terminal (DEXHEIMER; POMMIER, 2008).

A ligação entre a TopIB e o DNA forma o chamado complexo de clivagem (CL), que uma vez formado permite com que a extremidade 5'OH-terminal fique livre e assim possa realizar sua rotação em torno da cadeia de

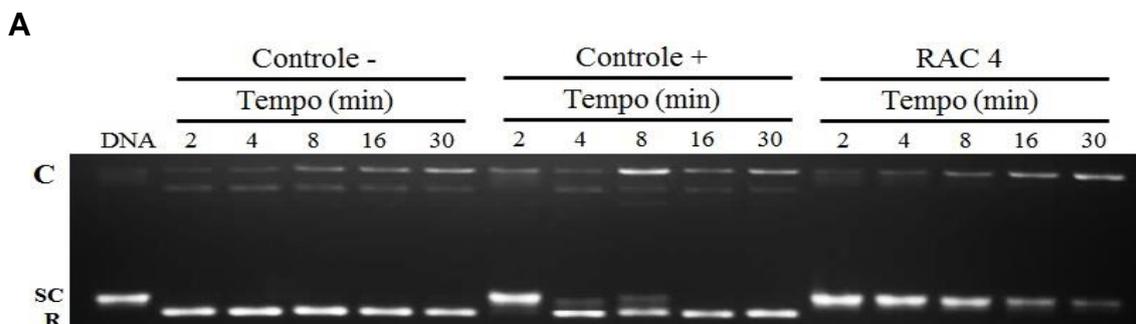
DNA, promovendo o relaxamento do DNA superenovelado, que uma vez relaxado induz a quebra do CL, deixando a TopIB livre para fazer o religamento das fitas do DNA (HOWARD et al., 1994; DEXHEIMER; POMMIER, 2008).

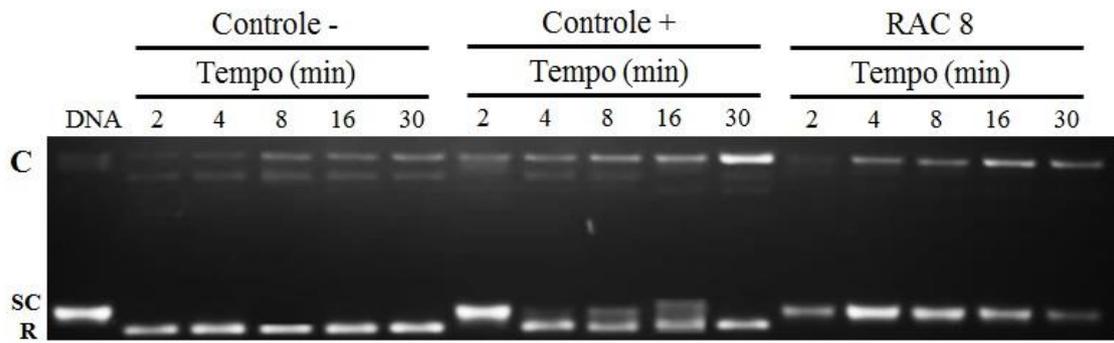
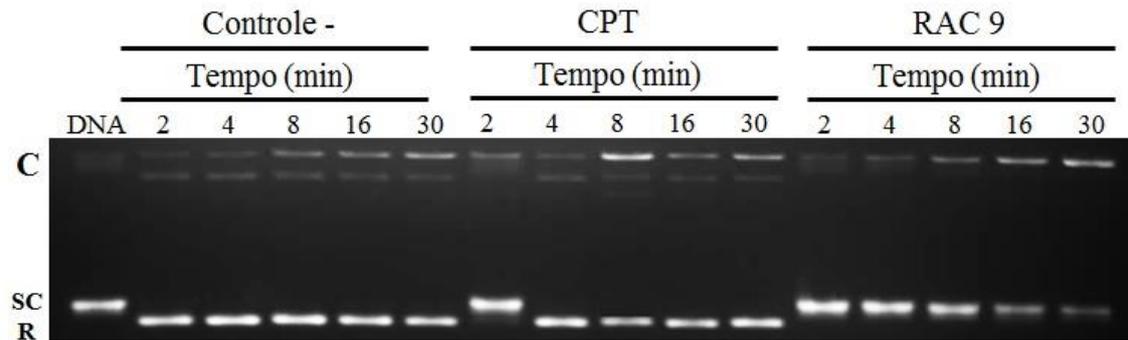
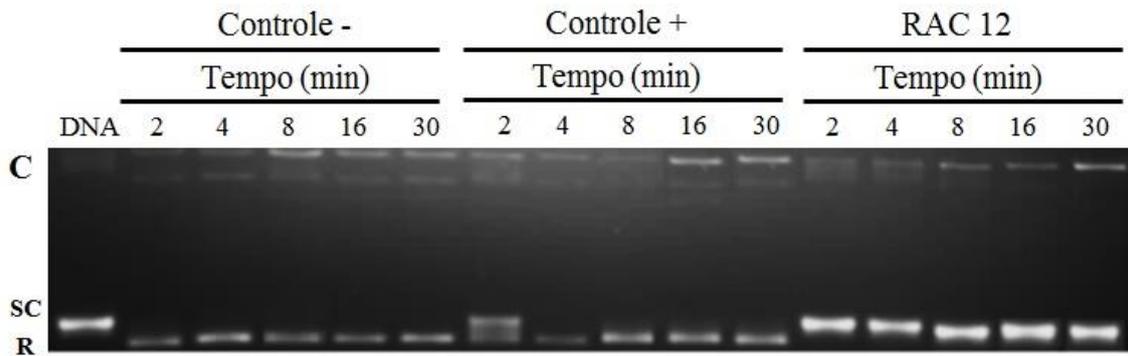
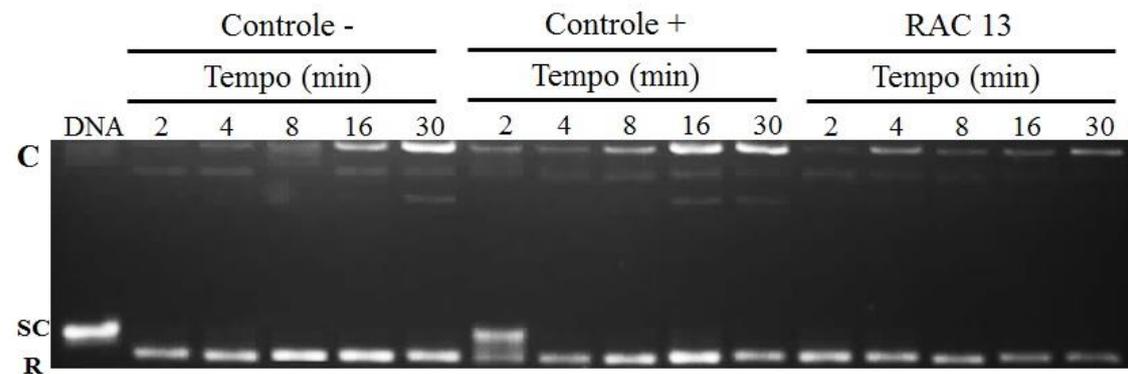
Uma das formas de investigar a eficiência de um inibidor de topoisomerase é avaliar a sua capacidade de manter a estabilidade dos complexos de clivagem, que uma vez estabilizado impede a TopIB de realizar o religamento das fitas de DNA, como consequência haverá acúmulo de DNA superenovelado e, por fim morte celular (HOWARD et al. 1994). Um exemplo de inibidor que garante a estabilidade do CL é o fármaco camptotecina, essa droga se une de forma irreversível ao CL (PRADA et al. 2013b).

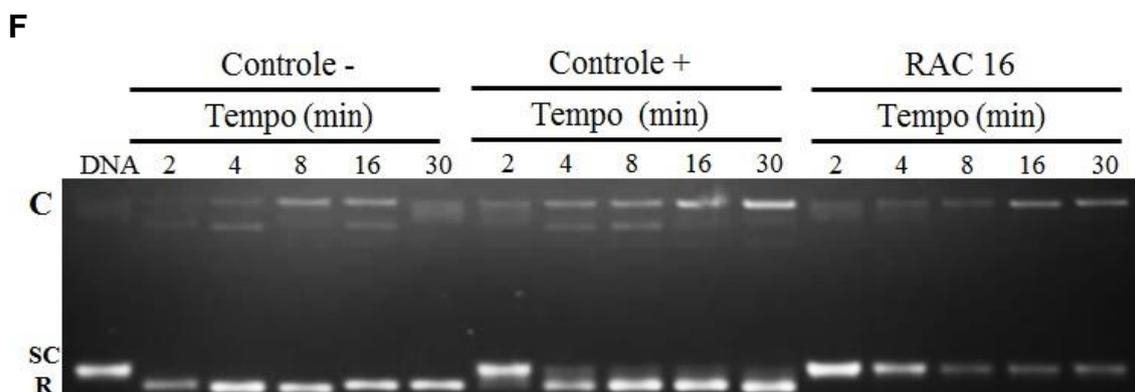
3.3.7. Detecção da formação de complexos de clivagem pelas substâncias RAC nas enzimas recombinantes LdTopIB.

Neste estudo foi investigada a capacidade das substâncias que apresentaram inibição total da atividade de LdTopIB em manter a estabilidade dos complexos de clivagem, o ensaio foi realizado a uma concentração fixa (100 μ M) em diferentes intervalos de tempo (Figura 54)

Figura 54 – Detecção de complexos de clivagem (CL) em presença de um plasmídeo superenovelado (psK) sob a atividade catalítica da LdTopIB pelas substâncias RAC4, RAC8, RAC9, RAC12, RAC13 e RAC16, comparando ao efeito do fármaco camptotecina. (A) RAC4; (B) RAC8; (C) RAC9; (D) RAC12; (E) RAC13 e (F) RAC16.



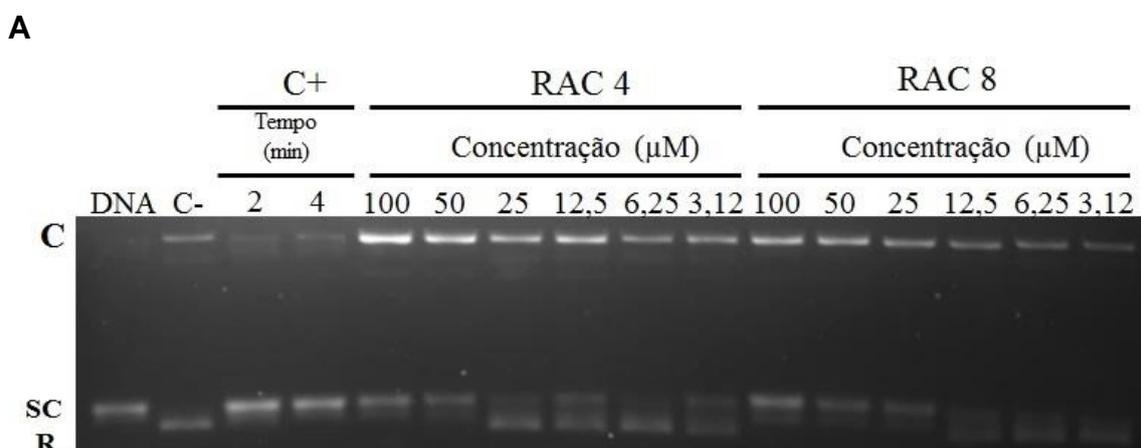
B**C****D****E**

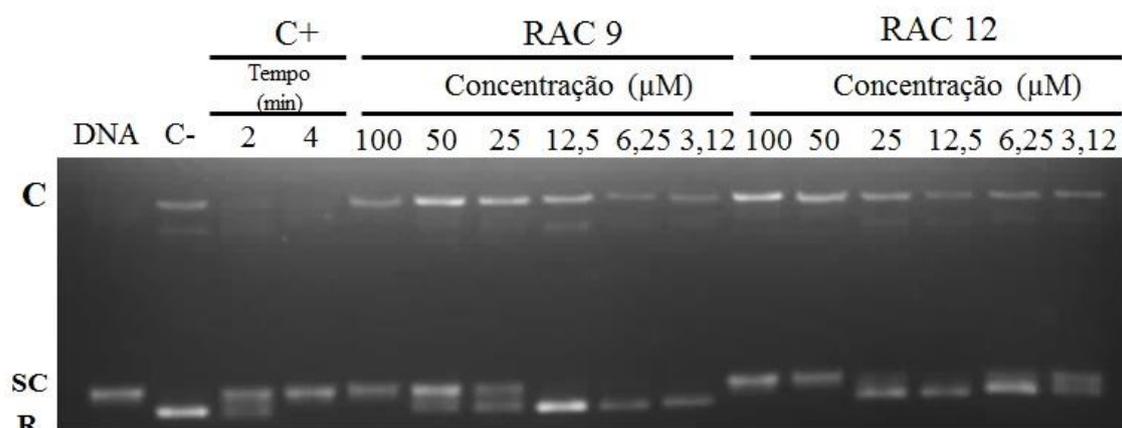
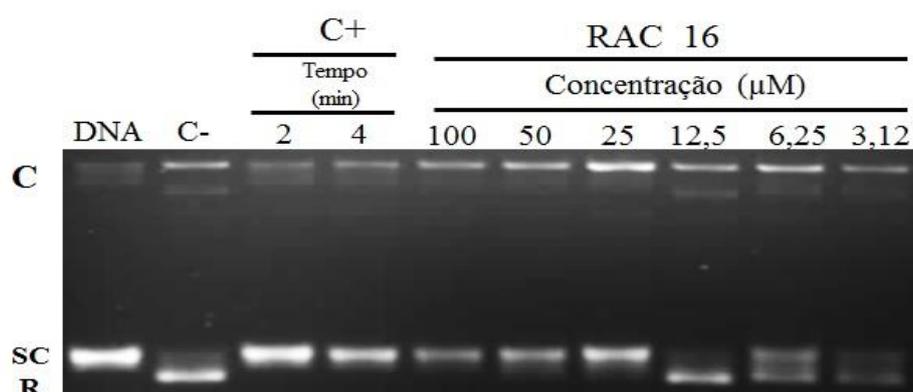


DNA (plasmídeo psK + DMSO 0,1%); Controle - (plasmídeo psK + LdTopIB sem inibidor); Controle + (plasmídeo + Camptotecina [100 μ M]); C (DNA cortado); SC (DNA superenovelado) R (DNA relaxado).

A análise dos géis de agarose com os complexos de clivagem, demonstraram que das substâncias testadas apenas a RAC13 não manteve a estabilidade do CL. As demais substâncias mantiveram a estabilidade do CL até 30 minutos. Diante dos resultados obtidos no ensaio de detecção de CL a uma concentração fixa, foi realizado o ensaio de detecção de CL em diferentes concentrações, com as substâncias em que houve registro de estabilidade de CL (Figura 55).

Figura 55 – Detecção de complexos de clivagem (CL) em presença de um plasmídeo superenovelado (psK) sob a atividade catalítica da LdTopIB pelas substâncias RAC4, RAC8, RAC9, RAC12, e RAC16, em diferentes concentrações, em 30 minutos a 37 °C, comparando ao efeito do fármaco camptotecina. (A) RAC4 e RAC8; (B) RAC9 e RAC12 e (C) RAC16.



B**C**

DNA (plasmídeo psK + DMSO 0,1%); Controle – (plasmídeo psK + LdTopIB sem inibidor); Controle + (plasmídeo + Camptotecina [100 μM]); C (DNA cortado); SC (DNA superenovelado) R (DNA relaxado).

Os resultados do ensaio de formação de CL em diferentes concentrações, confirmou a capacidade das substâncias RAC4, RAC8, RAC9, RAC12 e RAC16, em formar os CL, apresentando resultados significativos quando comparados com os resultados da camptotecina. Deste modo, é possível afirmar que, além de inibir a atividade enzimática, no que concerne a incapacidade de relaxar o DNA superenovelado, permite a estabilidade do CL, impedindo a TopIB de religar as cadeias de DNA cortada. Em geral, a formação de CL pela camptotecina tem uma duração rápida, não ultrapassando dois minutos (PRADA et al., 2013b). Com a formação de CL, a rotação da dupla hélice e o religamento das fitas cortada é um processo muito rápido, em geral não ultrapassa os quatro minutos (HOWART et al., 1994), pode-se afirmar que o

tempo de formação de CL pelas substâncias testadas foi suficiente para garantir a eficiência dos seus efeitos.

Vários trabalhos relatam o efeito inibitório de substâncias naturais e semissintéticas sob a atividade catalítica das topoisomerases, entretanto poucos relatam o efeito de alcanidas. Lira (2012) observou a inibição da atividade catalítica de topoisomerase II humana por duas alcanidas isoladas das folhas de *Aplysina fistularis*. O efeito inibidor da alcanida plipartina foi investigado frente a topoisomerase humana, e a mesma apresentou atividade inibitória moderada até a concentração de 25 μ M (BEZERRA, 2008).

Não foram encontrados relatos de efeitos inibitórios sobre a atividade enzimática de topoisomerase IB de leishmania por alcanidas. De modo que, o efeito inibitório de alcanidas sobre a atividade enzimática de LdTopIB registrado neste trabalho, é inédito.

Das 16 alcanidas testadas, as RAC4, RAC8, RAC9, RAC12 e RAC 16 apresentaram os resultados mais promissores como protótipos leishmanicidas, uma vez que apresentaram significativos efeitos leishmanicidas sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, *L. chagasi* e *L. infantum* e não apresentar toxicidade para as células de mamíferos, macrófagos J774; bem como, foram capazes de inibir a atividade enzimática da topoisomerase de leishmania e formar complexos de clivagem, sem afetar a atividade da enzima homóloga humana. Destas substâncias as RAC4 e RAC12 são inéditas e as RAC8, RAC9 e RAC 16 são alcanidas naturais.

4. Conclusões

- As alcanidas testadas, não apresentaram citotoxicidade para os macrófagos até a concentração máxima testada (100 μ M), com exceção das RAC2, RAC6 e RAC13.
- As alcanidas apresentaram potente efeito leishmanicida sobre as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonenses*; e efeito moderado sobre as formas promastigotas e amastigotas de *L. chagasi* e *L. infantum* iFRP70.
- Todas as RAC testadas foram capazes de inibir a atividade catalítica da LdTopIB e não inibir a atividade da hTop1, com destaque para as RAC4, RAC8, RAC9, RAC12 e RAC16, que se destacaram como potentes inibidores sendo substâncias a serem exploradas como drogas candidatas a fármacos leishmanicidas.
- As RAC4, RAC8, RAC9, RAC12 e RAC16 além de apresentarem um efeito inibitório potente sob a atividade da LdTopIB, foram capazes de estabilizar os complexos de clivagem formados pela união LdTopIB-DNA, impedindo o processo de religamento das fitas de DNA, comportando-se como potentes “venenos” enzimáticos.
- As RAC4 (inérita), RAC8, RAC9, RAC12 (inérita) e RAC 16 (inérita), foram consideradas os protótipos leishmanicidas mais promitentes, uma vez que foram ativos para as formas promastigotas e amastigotas das três espécies de leishmanias testadas; inibiram de forma seletiva a atividade enzimática da LdTopIB e formaram complexos de clivagens estáveis, interferindo de forma efetiva as funções enzimáticas atreladas ao corte e religamento da fita de DNA do parasito. Estas alcanidas não foram tóxicas para células de mamíferos (macrófagos J774).
- A expressiva atividade inibitória sob o crescimento de diferentes espécies de leishmania e a ação de modo seletivo sob a atividade da topoisomerase IB de leishmania torna as alcanidas testadas neste estudo, substâncias promissoras para quimioterapia das leishmanioses.

5. Referências Bibliográficas

ALTHAUS, J. B.; KAISER, M.; BRUN, R.; SCHIMIDT, J. J. Antiprotozoal activity of *Achille ptarmica* (Asteraceae) and its main alkaloid constituents. **Molecules**, v.19, p.6428-6438, 2014.

ALVAREZ, A. M. M. Leishmaniasis. Aspectos de interés sobre un parasitismo exótico para Cuba Leishmaniasis: Interesting features on exotic parasitism for Cuba. **Revista Cubana de Higiene y Epidemiología**, v.48, n.1, p.78-92, 2010.

ARAUJO, E. J. F.; LIMA, L. K. F.; SILVA, O. A.; RESENDE-JUNIOR, L. M.; GUTIERREZ, S. J. C.; CARVALHO, F. A. A.; LIMA, F. C. A.; PESSOA, C.; FREITAS, R. M.; FERREIRA, P. M. P. In vitro antioxidant, antitumor and leishmanicidal activity of riparin A; an analog of the Amazon alkaloids from *Aniba riparia* (Lauraceae). **Acta Amazonica**, 36, n.3, p.309-314, 2016.

BAREA, C.; PABÓN, A.; PÉREZ-SILANES, S.; GALIANO, S.; GONZALEZ, G.; MONGE, A.; DEHARD, E.; ALDANA, I. New amide derivatives of quinoxaline 1,4-di-N-oxide with leishmanicidal and plasmodial activities. **Molecules**, v.18, n.4, p.4718-4727, 2013.

BAUER, R.; REMIGER, P. TLC and HPLC analysis of alkaloids in *Echinacea* drugs. **Planta Medica**, v.55, n.4, p.367-371, 1989.

BEZERRA, D. P. **Estudos das propriedades da Plipartina**. 2008. 273f. Tese (Doutorado em Fisiologia e Farmacologia), Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2008.

BODIWALA, H. S.; SINGH, G.; SINGH, R.; DEY, C. S.; SHARMA, S. S.; BHUTANI, K. K.; SINGH, I. P. Antileishmanial activity amides and lignans from *Piper cubeba* and *Piper retrofractum*. **Journal Natural Medicines**, v.61, n.4, p.418-421, 2007.

CABANILLAS, B. J.; LELAMER, A. C.; CASTILLO, D.; AREVALO, J.; ROJAS, R.; ODONNE, G.; BOURDY, G.; MOUKARZEL, B.; SAUVAIN, M.; FABRE, N. Caffeic acid esters and lignans from *Piper sanguincispicum*. **Journal of Natural Products**, v.73, p.1884-1890, 2010.

CALVO-ÁLVARES, E.; GUERRERO, N. A.; ÁLVAREZ-VILELLA, R.; PRADA, C. F.; REQUERA, J. M.; PUNZÓN, C.; LLAMAS, M. A.; ARÉVELO, F. J.; RIVAS, L.; FRENO, M.; PEREZ-PETERJO, Y.; BALAÑA-FOUCE, R.; REGUERA, R. M. Appraisal of *Leishmania major* strain stably expressing mCherry fluorescent protein for both *in vitro* and *in vivo* studies of potential drugs and vaccine against cutaneous leishmaniasis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, v.6, n.11, p.e-1927-e-1938, 2012.

CARRARA, V. S.; CUNHA-JUNIOR, E. F.; TORRES-SANTOS, E. C.; CORRÊA, A. G.; MONTEIRO, J. L.; DEMARCHI, I. G.; LONARDONI, M. V.; CORTEZ, A. G. Antileishmanial activity of amides from *Piper amalago* and synthetic analogs. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 23, n.3, p.447-454, 2013.

CHEN, Y.; FU, T.; TAO, T.; YANG, J.; CHANG, Y.; WANG, M.; KIM, L.; QU, L. Macrophage active ating effects of new alkamides from the roots of Echinacea species. **Journal of Natural Products**, v.68, p.773-776, 2005.

CRUZ, I.; CHEETHAM, J. J.; ARNASSON, J. J.; YACK, J. E.; SMITH, M. L.; Alkamides from *Echinaceae* disrupt the fungal cell wall-membrane complex. **Phytomedicine**, v.21, n.4, p.435-442, 2014.

DAS, B. B.; GANGULY, A.; MAJUMDER, K. DNA topoisomerase of *Leishmania*: the potential targets for anti-leishmanial therapy. In: MAJUMDER (Org). Drug Targets in Kinetoplastide Parasites. **Landes BioScience**, 2007, p.1-13.

DEXHEIMER, T. S.; POMMIER, Y. DNA cleavage assay for the identification of topoisomerase I inhibitors. **Nature Protocols**, v. 3, n.11, p.1736-1750, 2008.

GARCÍA-CHAVEZ, A.; RAMIREZ-CHAVEZ, E.; MOLINA-TORRES, J. El género *Heliopsis* (heliantheae; asteraceae) en México y las alcanidas presentes en sus raíces. **Acta Botanica Mexicana**, v.69, p.115-131, 2004.

GREGER, H. Alkaloids: a critical reconsideration of a multifuncional class of unsaturated fatty acid amides. **Phytochemistry Reviews**, v.2015, p.1-42, 2015.

GREGER, H. Alkamides: structural relationships, distribution, and biological activity. **Planta Medica**, v.50, n.5, p. 366-375, 1984.

HO, C. C.; LUANG, C. C.; SHYUR, L. F. Echinaceae alkamides prevent lipopolysaccharide/D-Galactosamine – Induced acute hepatic injury though JNK pthaway-mediated HD-1 Expression. **Journal Agricultural Food Chemistry**, v.54, n.22, p.11966-11974, 2011.

HOWARD, M. T.; NEECE, S. H.; MATSON, S. W.; KREUZER, K. N. Disruption of a topoisomerase-DNA cleavage complex by a DNA helicase. **Biochemistry**, v.91, p.12031-12035, 1994.

HUSSAIN, R. F.; NOURI, A. M.; OLIVER, R. T. A new approach for measurement of cytotoxicity using colorimetric assay. **Journal Immunology Methods**, v.160, p.89-96, 1993.

JACOBSON, M. Constituents of *Heliopsis* specie. 1 scabin, an insecticidal amide from roots of *H. scabra*. **Journal America Chemistry Society**, v.73, p.100-103, 1951.

JACOBSON, M. The unsaturated insobulyamides. In: JACONSON, M.; GROSBY, E. D. (Org). **Naturally ocurring insetices**. Marcel Dekker, New York, NY, 1971, 197p.

LAINSON, R. Espécies neotropicais de leishmania: uma breve revisão histórica sobre sua descoberta, ecologia e taxonomia. **Revista Pan Americana de Saúde**, v.1, n.2, p.13-32, 2010.

LIRA, N. S. **Estudo químico dos organismos marinhos *Alpysina fisturalis* e *Sargassum polycaratum***. 2012. 203f. Tese (Doutorado em Produtos Naturais e Bioativos), Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2013.

MIYAKADO, M.; NAKAYAMA, F.; OHNO, N. Inseticidal unsaturated isobutyramides. IN: ARNASON, J. T.; PHILOGENE, B. J. R.; MORAND, P. (Eds). **Inseticides of Plant Origin**, ACS: Washington, 1989, p.187p.

MOLINA-TORRES, J. H.; CHÁVEZ, A. G.; Alcamidas en plantas: distribución y importancia. **Avance y Pespctive**, v.20, p.377-387, 2001.

MORENO, S. C.; CARVALHO, G. A.; DICANÇO, M. C. Bioactivity of Compounds from *Acmella olleraceae* against *Tuta absoluta* (Meyrick) (Lepidoptera:Gelechiidae) and selectivity to two non-target species. **Pest Management Science**, v.68, n.3, p.386-393, 2012.

MULLER-JAKIC, B.; BREU, N.; PROBSHE, A.; RED, K.; GREGER, H.; BAUER, R. In vitro inhibitions of cyclooxygenase and 5-lipoxygenase by alkaloids from Echinaceae and achillea species. **Planta Medica**, v.60, n.1, p.37-40, 1994.

NITISS, J. L.; SOANS, E.; ROGOTINA, A.; SESH, A.; MISHINA, M. Topoisomerase Assays. **Current Protocol Pharmacology**, v.3, p.1-33, 2012. doi: 10.1002/10471141755./ph03033357.

NOYES, H. A. Implications of a neotropical origin of the genus *Leishmania*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v.93, n.5, p.657-652, 1998.

NUNES, M. P.; CYSNE-FINKELSTAIN, L.; MONTEIRO, B. C.; SOUZA, D. M.; GOMES, N. A.; DOSREIS, G. A. CD40 signaling induces reciprocal outcomes in Leishmania-infected macrophages; roles of host genotype and cytokine milieu. **Microbiology and Infectious Diseases**, v.7, p.78-85, 2005.

PRADA, C. F. **Estudio de las regiones implicadas en la funcionalidad y resistencia a fármacos de la ADN topoisomerasa IB de *Leishmania***. 2013. 246f. Tese (Doctorado en Ciencia), Facultad de Medicina Veterinaria, Universidad de León, León, España, 2013a.

PRADA, C. F.; ÁLVAREZ-VELILLA, R.; BALAÑA-FOUCE, R.; PRIETO, C.; CALVO-ÁLVAREZ, E.; ESCUDERO-MARTÍNEZ, J. M.; REQUENA, J. M.; ORDOÑEZ, C.; DESIDERI, A.; PÉREZ-PERTEJO, Y.; REGUERA, R. M. Gimatecam and other camptothecin derivatives poison Leishmania DNA-topoisomerase IB leading to a strong leishmanicidal effect. **Biochemical Pharmacology**, v.85, p.1433-1440, 2013b.

RAMIREZ-CHAVES, E.; LÓPEZ-BUCIO, J.; HERRERA-ESTRELLA, L.; MOLINA-TORRES, J. Alkaloids isolated from plants promote growth and alter root development in Arabidopsis. **Plant Physiology**, v.134, n. 3, p.1058-1068, 2004.

RIO-CHAVEZ, P.; RAMIREZ-CHAVES, R.; ARRENTA-SALINAS, C.; MOLINA-TORRES, J. *Acmella radicans* var. *radicans*: *in vitro* culture establishment and alkaloid content. **In vitro Cell Development Biological of Plants**, v.39, p.37-41, 2003.

RIOS, M. Y. Natural alkaloids: pharmacology, chemistry and distribution. IN: VALISSUTA, O.; OLIMAT, S. M. (orgs). **Pharmacology, Toxicology and Pharmaceutical Science**. INTECH, 2012, 846p.

ROSS, S. A.; AL-AZIB, M. A.; KRISHNAVENI, K. S.; FRONCZEK, F. R.; BURANDT, C. L. Alkaloids from the leaves of *Zanthoxylum syncupum*. **Journal Natural Products**, v.68, n.8, p.1297-1299, 2005.

SAHI, S.; TEWATI, P.; GHOSAL, S. *Leishmania donovani* pteridine reductase 1: comparative protein modeling and protein-ligand interactions studies of the leishmanicidal constituents isolated from the fruits of *Piper logum*. **Journal of Molecular Modeling**, v.18, n.12, p.5065-5073, 2012.

SPELMAN, K.; DEPOIX, D.; MCCRAY, M.; MOURAY, E.; GRELLIER, P. The traditional medicine *Spilanthes acmella*, and the alkaloids spilanthol and undeca-2E-ene-8,10-dienoic acid isobutylamide, demonstrated *in vitro* and *in vivo* anti-malarial activity. **Phytotherapy Research**, v.25, n.7, p.1098-1101, 2011.

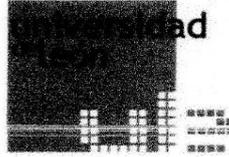
TEJERÍA, A.; PÉREZ-PERTEJO, Y.; REGUERA, R. M.; BALAÑA-FOUCE, R.; ALONSO, C.; FUERTES, M.; GONZÁLEZ, M.; RUBIALES, G.; PALACIOS, F. Antileishmanial effects of new indole-1,5-naphthyridines, selective inhibitors of *Leishmania infantum* type IB DNA topoisomerase. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v.124, p.740-749, 2016.

TIUMAN, T.S.; UEDA-NAKAMURA, T.; CORTEZ, D.A.G.; DIAS FILHO, B.P.; MORGADO-DÍAZ, J.A.; DE SOUZA, W.; NAKAMURA, C.V. Antileishmanial activity of parthenolide, a sesquiterpene lactone isolated from *Tanacetum parthenium*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**, v.49, p. 176–182, 2005.

VILLA, H.; OTERO-MARCOS, A. R.; REGUERA, R. M.; BALAÑA-FOUCE, R.; GARCÍA-ESTRADA, C.; PÉREZ-PERTEJO, Y.; TEKWANI, B. L.; MYLER, P. J.; STUART, K. D.; BJORNSTU, M. A.; ORDOÑEZ, D. A novel active DNA topoisomerase I in *Leishmania donovani*. **Journal Biological Chemistry**, v.278, p.3521-3526, 2003.

WU, L.; FAN, N.; LIN, M.; CHU, I.; HUANG, S.; HU, C.; HAN, S. A. Anti-inflammatory effect of spilanthol from *Spilanthes acmella* on murine macrophage by down-regulating LPS-induced inflammatory mediators. **Journal Agriculture Food Chemistry**, v.56, p.2341-2349, 2008

ANEXO 1

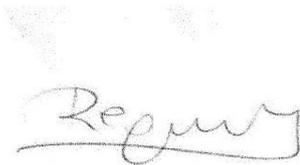


Comité de Ética para la Investigación

INFORMA:

Que habiendo estudiado la solicitud del Laboratorio de Farmacología e Toxicología para investigación con animales, que el proyecto de investigación "Búsqueda de compuestos con efecto leishmanicida en ensayos *in vivo* y *ex vivo* con cepas de *Leishmania* spp. iRF70", fue analizado y considerado APROBAVO pelo este Comité para la Investigación de la ULE, en 04 de febrero de 2015, con fecha de caducidad en 04 de enero de 2017, bajo la supervisión del Dr. Rafael Balaña-Fouce, profesor de este Dpt.

Lo que firmo en León a 04 de Febrero de 2015



Av. Facultad de Veterinaria, 25, 24004 León, España.
Telefono: +34 987 29 10 00