

UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS-
GRADUAÇÃO
EM BIOTECNOLOGIA

**INVESTIGAÇÃO DE ALCALOIDES DE *Lauraceae* DA
AMAZÔNIA COMO TRATAMENTO PARA
TRIPANOSOMÍASE E LEISHMANIOSE: AVALIAÇÃO
FENOTÍPICA E BUSCA DE ALVOS MOLECULARES**

NILMA DE SOUZA FERNANDES

MANAUS
MAIO 2017

NILMA DE SOUZA FERNANDES

**INVESTIGAÇÃO DE ALCALOIDES DE *LAURACEAE* DA
AMAZÔNIA COMO TRATAMENTO PARA TRIPANOSOMÍASE E
LEISHMANIOSE: AVALIAÇÃO FENOTÍPICA E BUSCA DE ALVOS
MOLECULARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Orientador: Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior

Co-orientador: Prof. Dr. Celso Vataru Nakamura

MANAUS

MAIO 2017

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

Fernandes, Nilma de Souza
F363i Investigação de alcaloides de Lauraceae da Amazônia como
tratamento para tripanosomiase e leishmaniose: avaliação
fenotípica e busca de alvos moleculares / Nilma de Souza
Fernandes. 2017
214 f.: il. color; 31 cm.

Orientador: Valdir Florêncio da Veiga Júnior
Coorientador: Celso Vataru Nakamura
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. Lauraceae. 2. Tripanosomatídeo. 3. Alcaloide. 4. Quinase. 5.
Superexpressão proteica. I. Veiga Júnior, Valdir Florêncio da II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

NILMA DE SOUZA FERNANDES

**INVESTIGAÇÃO DE ALCALOIDES DE *LAURACEAE* DA AMAZÔNIA COMO
TRATAMENTO PARA TRIPANOSOMÍASE E LEISHMANIOSE: AVALIAÇÃO
FENOTÍPICA E BUSCA DE ALVOS MOLECULARES**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos necessários para a obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Banca julgadora:

Prof Dra. Marne C. de Vasconcelos

Prof. Dr. Emerson Silva Lima

**Prof. Dra. Rita de Cássia S. Nunomura
Silva**

**Prof. Dr. Carlos Gustavo N. da
Silva**

**Prof. Dr. Valdir Florêncio da Veiga Junior
Orientador – Presidente da banca**

Este trabalho foi realizado no Laboratório de Química de Biomoléculas da Amazônia, no Centro de Apoio Multidisciplinar (CAM) no Departamento de Química, da Universidade Federal do Amazonas, no Laboratório de Inovação Tecnológica e Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos e Complexo de Centrais de Apoio à Pesquisa, na Universidade Estadual de Maringá e no Centro de Imunologia e Infecção, Universidade de York, Reino Unido.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram para minha formação pessoal e profissional durante estes quatro anos. Foram grandes amizades e colaborações formadas de norte a sul do Brasil, além de grandes amigos no exterior. Seria impossível descrever aqui o que cada um representou para mim. Sem dúvida, os melhores resultados desta tese foram os amigos e experiências conquistadas! Obrigada a todos!

Às agências de fomento, cujo apoio permitiu a realização deste estudo: FAPEAM e Fundação Auracária. Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado no país e no exterior, as quais foram essenciais para realização da tese.

Ao orientador Valdir Florêncio da Veiga Junior, por ter me permitido o contato com diversos laboratórios e técnicas, me fazendo crescer pessoal e profissionalmente. Pelas conversas, discussões científicas e incentivo contínuo da minha autocrítica, as quais foram essenciais para minha formação.

Ao coorientador, Celso Vataru Nakamura, por ter me recebido em seu laboratório e por todo apoio teórico e estrutural para realização dos ensaios *in vitro* e *in vivo*.

To my advisors, Prof. Jeremy Mottram and Pegine Walrad, thank you for all the advice and help! You were amazing and I have learned how to be a good researcher and a good person. I miss you!

Aos amigos dos grupos de pesquisa que fiz parte durante todo o doutorado. Cada grupo deixou sua marca e foi essencial para as diferentes etapas do projeto. Todos os momentos, sejam eles de alegria e distrações, quanto os problemas foram plenos e inesquecíveis graças a vocês. Ao grupo Q-Bioma (UFAM), que me recebeu e me ajudou no aprendizado e isolamento das substâncias, totalmente fora da minha área. Obrigada pela paciência! Todos pesquisadores do grupo foram essenciais para meu aprendizado e realização dos experimentos. Ao grupo do Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos (UEM), que me apoiaram e me fizeram sentir parte do grupo desde o início.

Ao grupo do Prof. Jeremy Mottram e todos amigos do CII (*University of York*), que fizeram a saudade do Brasil ser menor e me mostraram que a biologia molecular pode ser divertida. *See you soon!!*

Ao programa de Pós-Graduação em Biotecnologia pelo apoio. Principalmente aos Coordenadores Dr. Edmar e Dr. Gustavo, por todo suporte e apoio.

Ao Junior, pela compreensão, amor, carinho e por me mostrar que a vida pode ser bem mais leve. “Valeu o dia!”

A minha família pelo amor e apoio incondicionais, sem os quais eu não chegaria até aqui. À minha mãe, Nelci, por me mostrar que mesmo durante momentos ruins, é preciso manter o sorriso e ser feliz. Sem a sua compreensão e ajuda, eu não teria chegado até este momento. Ao meu irmão, José Afonso, pelas conversas, brincadeira e amizade! Ao meu pai, que deixou, além da saudade, a vontade de sempre seguir em frente. Ao Yuri, meu “irmãozinho”, que, apesar de barulhento, eu amo muito!

*“Around here, however, we don't look backwards for very long.
We keep moving forward,
opening up new doors and doing new things,
because we're curious...
and curiosity keeps leading us down new paths.”*

Walt Disney

RESUMO

Espécies pertencentes à família *Lauraceae* são ricas em alcaloides e outras substâncias bioativas com alto potencial farmacêutico, inclusive atividades contra os tripanosomatídeos *Leishmania* spp. e *Trypanosoma cruzi*. Esses são, respectivamente, protozoários agentes etiológicos de leishmaniose e doença de Chagas, doenças que afetam milhões de pessoas em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. As opções terapêuticas disponíveis atualmente para o tratamento de infecções causadas por esses parasitos têm severos efeitos colaterais e baixa eficácia, sendo a busca por novos fármacos de extrema importância. No sentido de buscar substâncias bioativas de plantas com potencial farmacêutico, foi realizada triagem *in vitro* utilizando extratos etanólicos de 12 espécies de *Lauraceae* contra *T. cruzi* e *L. amazonensis* a fim de encontrar os extratos mais promissores. Ainda, foi proposto a geração de uma ferramenta molecular para utilização na busca por substâncias ativas frente a *L. mexicana*. Os extratos mais ativos foram submetidos à partição ácido-base e as frações alcaloídicas avaliadas. A partir desse ensaio bioguiado, 6 alcaloides foram isolados e a atividade *in vitro* frente aos tripanosomatídeos avaliada. O alcaloide indólico 3-metoxi-2-oxa-4,10b-diaza-1,3,6a,10c-tetrahidrofluorantano-3,5-diol foi ativo contra *T. cruzi* e *L. amazonensis*. Este alcaloide induz alterações morfológicas e bioquímicas em promastigotas de *L. amazonensis*, atuando na divisão celular, com bloqueio na citocinese, processo autofágico e conseqüente colapso celular e morte. Já os resultados obtidos na parte final, com foco na ferramenta molecular para busca por substâncias, foi demonstrado pela primeira vez a superexpressão induzida de proteína endógena neste protozoário. Ainda, foi gerado modelo de superexpressão de proteínas que poderá ser utilizado para analisar as alterações fenotípicas, inferir funções de proteínas, ensaios para busca de fármacos, bem como compreender a complexa biologia de *L. mexicana*. As duas abordagens utilizadas resultaram em dados inéditos que permitem a continuação tanto dos trabalhos fitoquímicos quanto os moleculares, a fim de buscar novos fármacos frente aos tripanosomatídeos utilizados.

Palavras-chave: *Lauraceae*, Tripanosomatídeo, Alcaloide, Proteína Quinase, Superexpressão proteica

ABSTRACT

Lauraceae family species are rich in bioactive compounds, including alkaloids, with high pharmaceutical potential, such as activities against *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. These protozoa are, respectively, etiological agents of cutaneous *Leishmaniasis* and Chagas' disease, which affect millions of people in underdeveloped and developing countries. Current therapeutic options available for treatment of these infections have severe side effects and low efficacy, for this reason, the development of effective and less toxic chemotherapeutic agents is extremely important. In order to find bioactive plant compounds with potential against these parasites, we performed an *in vitro* screening with ethanolic extracts of 12 species of *Lauraceae* against *T. cruzi* and *L. amazonensis*. Furthermore, a new molecular approach had been proposed to identify molecular drug targets in *L. mexicana*. The most active extracts were submitted to acid-base partition and the fractions have been evaluated. The bioguided assay led to isolation of 6 alkaloids. A new indole alkaloid isolated from *A. panurensis*, 3-methoxy-2-oxa-4,10b-diaza-1,3,6a,10c-tetrahydrofluoranthene-3,5-diol, had moderate activity against the three forms of *T. cruzi* and *Leishmania amazonensis* promastigotes. It was also shown that this alkaloid induces morphological and biochemical modifications in *L. amazonensis* promastigotes, impairing cytokinesis and generating cells with multiple nuclei and flagella. The compounds tested in this thesis show potential for modifications to its structure to improve activity and could potentially be tested in other parasites. The second chapter of the thesis aims to validate an inducible overexpression approach for *L. mexicana*, which could be used to generate an overexpression library. The results demonstrated for the first time the expression of an endogenous *L. mexicana* kinase (CRK3). Furthermore, a new system to inducible overexpression had been produced. This new molecular tool is suitable for all life cycle stages and could be used as a tool for drug discovery and to understand the complex biology of the parasite. The phytochemical and molecular approaches used here resulted in original data which will help the discovery for new molecules against the trypanosomatids.

Key words: *Lauraceae*; Trypanosomatids, Alkaloids, Kinase; Protein Overexpression

LISTA DE FIGURAS

Capítulo I

| | |
|---|----|
| Figura 1 - Distribuição das espécies de <i>Lauraceae</i> Juss. A espécie tem predominância das espécies na América do Sul. | 27 |
| Figura 2- Mapa de distribuição de ensaios clínicos relacionados aos produtos naturais em todo mundo..... | 30 |
| Figura 3 - Representação esquemática das organelas de epimastigota de <i>Trypanosoma cruzi</i> | 35 |
| Figura 4 – Formas evolutivas encontradas na família <i>Trypanosomatidae</i> | 38 |
| Figura 5 - Alvos moleculares em tripanosomatídeos..... | 40 |
| Figura 6 – Abordagens fenotípicas na descoberta de novas substâncias anti-tripanosomatídeos. | 42 |
| Figura 7- Estrutura do fexinidazol. Substância nitro heterocíclica em teste clínico contra tripanossomíases..... | 43 |
| Figura 8 – Mapa de distribuição de leishmanioses no mundo. | 44 |
| Figura 9- Desenho esquemático do ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp. | 45 |
| Figura 10 – Estrutura dos principais fármacos utilizados no tratamento de leishmanioses. | 47 |
| Figura 11 - Mapa de distribuição de doença de Chagas no mundo..... | 48 |
| Figura 12 - Esquema ilustrativo do ciclo de vida de <i>T. cruzi</i> | 51 |
| Figura 13 - Estrutura dos principais fármacos utilizados no tratamento de doença de Chagas..... | 52 |
| Figura 14 – Representação esquemática das atividades das atividades realizadas nas três primeiras partes da tese, as quais englobam o capítulo I..... | 54 |
| Figura 15 - Fluxograma simplificado da partição ácido-base. Os extratos etanólicos e as frações 1 e 2 foram utilizadas nos ensaios de atividade biológica. | 56 |
| Figura 16 - Fluxograma do ensaio bioguiado utilizando tripomastigotas de <i>T. cruzi</i> como modelo..... | 68 |
| Figura 17 - Espectro de massas total para confirmação do isolamento de anibina. | 77 |
| Figura 18- Espectro de massas para confirmação do isolamento de 3-metoxi-2-oxa-4,10b-diaza-1,3,6a,10c-tetrahidrofluoranthano-3,5-diol..... | 78 |
| Figura 19 - Estrutura dos alcaloides isolados. (A) Anibina; (B) 3-metoxi-2-oxa-4,10b-diaza-1,3,6a,10c-tetrahidrofluoranthano-3,5-diol (1). | 78 |
| Figura 20- Alterações morfológicas em promastigota de <i>L. amazonensis</i> após tratamento com 10 μ M de (1) por 72 horas..... | 83 |
| Figura 21 - Alterações morfológicas em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com (1) por 72 h. | 85 |
| Figura 22- Citometria de fluxo do volume celular em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com o composto (1) por 24 h..... | 86 |
| Figura 23- Formação de vacúolos autofágios em formas promastigota de <i>L. amazonensis</i> tratadas com (1)..... | 88 |
| Figura 24- Acúmulo de corpos lipídicos em <i>L. amazonensis</i> tratados com a substância (1) | 89 |
| Figura 25- Formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com (1)..... | 91 |
| Figura 26- Citometria de fluxo de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com (1) por 24 h e marcadas com Rh 123. | 92 |

Capítulo II

| | |
|---|-----|
| Figura 1- Envolvimento de ciclinas e quinases dependentes de ciclina no ciclo de divisão celular..... | 100 |
| Figura 2- Ciclo celular em promastigotas de <i>L. mexicana</i> | 102 |
| Figura 3- Ciclo catalítico de fosforilação proteica por uma quinase..... | 104 |
| Figura 4- Desenho esquemático da regulação da expressão por tetraciclina..... | 111 |
| Figura 5 - Esquema do método de superexpressão para descoberta de alvos de fármacos em <i>T. brucei</i> | 112 |
| Figura 6 - Representação esquemática dos vetores utilizados na cepa gerada de <i>L. tarentolae</i> | 115 |
| Figura 7: Desenho esquemático do processo de clonagem utilizado. | 123 |
| Figura 8– Representação do plasmídeo pVY107 utilizado para inserção dos genes de interesse na cepa de <i>L. mexicana</i> T7TR..... | 131 |
| Figura 9– Resultado do BLAST da sequência obtida por sequenciamento da colônia com o gene anotado de CRK3. | 132 |
| Figura 10 - Representação do plasmídeo pVY107_CRK3 após clonagem do gene <i>CRK3</i> | 133 |
| Figura 11 - Representação esquemática da integração do plasmídeo no <i>locus</i> β -tubulina em <i>L. mexicana</i> | 134 |
| Figura 12 – Perfil eletroforético em gel de agarose do produto da PCR após amplificação com os iniciadores OL5604 e OL5605. | 135 |
| Figura 13 - Western blot demonstrando a superexpressão induzida de CRK3 em <i>L. mexicana</i> após cultivo com tetraciclina. | 136 |
| Figura 14– Análise do conteúdo de DNA e perfil do ciclo celular após indução da cepa LmCRK3::GFP e Lm por citometria de fluxo. | 137 |
| Figura 15 - Representação do plasmídeo pVY107_CYCA após clonagem do gene <i>CYCA</i> | 139 |
| Figura 16– Perfil eletroforético em gel de agarose do produto da PCR após amplificação com os iniciadores OL5604 e OL5605 dos clones de LmCYCA::GFP. | 140 |
| Figura 17- Western blot demonstrando a superexpressão induzida de CYCA em promastigotas de <i>L. mexicana</i> após cultivo com tetraciclina. | 141 |
| Figura 18 – Curva de crescimento de promastigotas de <i>L. mexicana</i> com (+tet) ou sem (-tet) adição de tetraciclina. | 142 |
| Figura 19 - Análise do conteúdo de DNA e perfil do ciclo celular após indução da cepa LmCYCA::GFP e Lm por citometria de fluxo. | 143 |
| Figura 20- Representação gráfica da densidade celular e diferenciação em amastigotas de <i>L. mexicana</i> superexpressando <i>CycA</i> | 146 |
| Figura 21– Western blot demonstrando a superexpressão induzida de CYCA em promastigotas e amastigotas axênicas de <i>L. mexicana</i> após indução com tetraciclina. | 148 |
| Figura 22 - Representação do plasmídeo pRIB (pGL631) utilizado para inserção do gene de T7 polimerase em <i>L. mexicana selvagem</i> | 150 |
| Figura 23- Perfil eletroforético em gel de agarose da construção do plasmídeo pRib-T7. (A) Produto da PCR após amplificação de T7 a partir do pVY087 com os iniciadores OL5672 e OL5673. | 151 |
| Figura 24 – Representação do plasmídeo pRIB (pGL472) utilizado para inserção do gene de repressor de tetraciclina em <i>L. mexicana</i> | 152 |
| Figura 25- Perfil eletroforético em gel de agarose da construção do plasmídeo pRib-TetR.. | 153 |

| | |
|--|-----|
| Figura 26 – Representação esquemática do fluxo de transfecção para gerar nova cepa co-expressando T7 e TetR. | 154 |
| Figura 27 - Representação esquemática dos vetores utilizados na cepa gerada de <i>L. mexicana</i> | 155 |
| Figura 28- Perfil eletroforético em gel de agarose do produto da PCR após amplificação com os iniciadores OL2380 e OL5673 da população após transfecção com pGL2652.. | 156 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|--------------------------|--|
| FDA | <i>Food and Drug Administration</i> |
| µg | Microgramas |
| µL | Microlitro |
| µM | Micromolar |
| AcOET | Acetato |
| ADP | Adenosina difosfato: <i>adenosine diphosphate</i> |
| ATP | Adenosina trifosfato: <i>adenosine triphosphate</i> |
| BCR-ABL1 | Complexo de genes fundidos formando o oncogene. BCR: Proteína de ponto de interrupção: <i>breakpoint cluster region</i> ; ABL: <i>Abelson</i> , derivado do nome do vírus que tem proteína similar |
| Bz | Benznidazol |
| CCCP | Cianeto de 3-clorofenilhidrazona |
| CCD | Cromatografia em Camada Delgada |
| CDK | Quinase dependente de ciclina: <i>Cyclin-dependent kinases</i> |
| CI | Concentração inibitória: CI ₅₀ 50% de inibição; CI ₉₀ 90% de inibição |
| CRK | Quinases relacionadas à Cdc2: <i>cdc2-related kinase</i> |
| CycA | proteína ciclina A |
| DFC | 2',7'-diclorofluoresceína |
| DFMO | Difluorometilornitina |
| DMSO | Dimetilsulfóxido |
| DNA | Ácido desoxirribonucleico: <i>deoxyribonucleic acid</i> |
| DTT | Ditiotreitol |
| ePKs | Proteínas quinase eucarióticas: <i>eukaryotic protein kinases</i> |
| EROs | Espécies reativas de oxigênio |
| ETC | Cadeia transportadora de elétrons: <i>electron transport chain</i> |
| g | Gramas |
| g | Gravidade |
| GFP | Proteína verde fluorescente: <i>green fluorescent protein</i> |
| h | Hora |
| HAT | Tripanossomíase africana: <i>human African trypanosomiasis</i> |
| HBE | Células humana epiteliais: <i>Human Bronchial Epithelial Cells</i> |
| hEPO | Eritropoietina humana: <i>human erythropoietin</i> |
| Hex | Hexano |
| IL-2 | Interleucina 2 |
| IP | Iodeto de propídeo |
| kb | Quilobase |
| kDa | Quilodalton |
| L | Litro |
| LB | Meio Luria-Bertani |
| LLCMK₂ | Célula de rim de <i>Macaca mulata</i> |

| | |
|-----------------|--|
| MAPK | Proteínas quinase ativadas por mitógenos: <i>mitogen activated protein kinases</i> |
| MDC | Monodancilcadaverina |
| MEM | Meio eagle modificado |
| MetOH | Metanol |
| Min | Minutos |
| MI | Mililitro |
| Mm | Milimolar |
| mRNA | RNA mensageiro: <i>messenger RNA</i> |
| NADH | <i>Nicotinamide adenine dinucleotide</i> em estado reduzido |
| Ng | Nanogramas |
| Nrf2 | <i>Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2</i> |
| Nx | Nifurtmox |
| °C | Graus Celsius |
| ODC | Ornitina descarboxilase |
| ORF | Fase aberta de leitura: <i>open reading frame</i> |
| p/v | peso/volume |
| PARP | Proteína repetitiva procíclicas ácida: <i>procyclic acidic repetitive protein</i> |
| Pb | Pares de base |
| PBS | Solução tampão fosfato: <i>phosphate-buffered saline</i> |
| PCR | Reação em cadeia da polimerase: <i>Polymerase Chain Reaction</i> |
| PFR | Haste paraflagelar: paraflagellar rod |
| Pg | Picogramas |
| PK | Proteína quinase: <i>protein kinase</i> |
| PMSF | Fluoreto de fenilmetilsulfonil: <i>phenylmethylsulfonyl fluoride</i> |
| pRb | Proteína do retinoblastoma |
| Q-bioma | Grupo de pesquisa em Química de Biomoléculas da Amazônia |
| RNA | Ácido ribonucleioc: <i>Ribonucleic acid</i> |
| RNAi | RNA de interferência: <i>RNA interference</i> |
| rpm | Revoluções por minuto |
| rRNA | RNA ribossomal: <i>ribosomal RNA</i> |
| SDS-PAGE | Dodecil sulfato de sódio-eletroforese em gel de poliacrilamida: <i>sodium</i> |
| Sec | Segundos |
| SFB | Soro fetal bovino inativado |
| TBE | Tris Borato EDTA |
| TBS-T | Solução salina tamponada com tris: <i>tris-buffered saline</i> |
| TcOYE | NADPH oxiredutase de <i>T. cruzi</i> |
| Tet | Tetraciclina |
| UTR | Região não traduzida: <i>untranslated region</i> |
| UV | Ultravioleta |
| V | Volt |
| v/v | volume/volume |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1. INTRODUÇÃO..... | 21 |
| 2. OBJETIVO GERAL..... | 24 |
| CAPÍTULO I | 25 |
| 1. OBJETIVO DO CAPÍTULO..... | 26 |
| 1.1 Objetivo geral | 26 |
| 1.2 Objetivos específicos | 26 |
| 2. REFERENCIAL TEÓRICO | 27 |
| 2.1 Família <i>Lauraceae</i> | 27 |
| 2.2 Produtos Naturais | 29 |
| 2.3 Alcaloides..... | 31 |
| 2.4 Tripanosomatídeos | 34 |
| 2.5 Tripanosomatídeos: descoberta de novos fármacos..... | 39 |
| 2.6 <i>Leishmania</i> spp..... | 43 |
| 2.7 <i>Trypanosoma cruzi</i> | 48 |
| 3. MATERIAL E MÉTODOS | 54 |
| 3.1 Análise fitoquímica | 54 |
| 3.1.1. Obtenção do material vegetal..... | 54 |
| 3.1.2 Obtenção dos extratos..... | 55 |
| 3.1.3 Obtenção das frações alcaloídicas | 56 |
| 3.1.4 Isolamento | 57 |
| 3.2 Atividade Biológica <i>in vitro</i> | 57 |
| 3.2.1 Cultivo de células..... | 58 |
| 3.2.1.1 <i>Trypanosoma cruzi</i> | 58 |
| 3.2.1.2 <i>Leishmania amazonensis</i> | 58 |
| 3.2.1.3 <i>Leishmania mexicana</i> | 58 |
| 3.2.2 Ensaio de viabilidade, proliferação e mecanismo..... | 59 |
| 3.2.2.1 Preparo das soluções estoque das substâncias | 59 |
| 3.2.2.2 Viabilidade e proliferação de <i>T. cruzi</i> | 59 |
| 3.2.2.3 Avaliação da atividade em amastigotas intracelulares de <i>T. cruzi</i> | 60 |
| 3.2.2.4 Avaliação da citotoxicidade em células de mamífero..... | 60 |
| 3.2.2.5 Atividade antiproliferativa em <i>Leishmania</i> spp..... | 61 |

| | | |
|----------|--|-----|
| 3.2.2.6 | Avaliação da citotoxicidade em macrófagos | 62 |
| 3.2.2.7 | Alterações morfológicas por microscopia eletrônica de varredura e transmissão | 62 |
| 3.2.2.8 | Citometria de fluxo | 63 |
| 3.2.2.9 | Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) total | 64 |
| 3.2.2.10 | Detecção de vacúolos autofágicos | 64 |
| 3.2.2.11 | Detecção de corpos lipídicos | 65 |
| 2.2.3 | Análise estatística | 65 |
| 4. | RESULTADOS E DISCUSSÃO | 66 |
| 4.1 | Extratos etanólicos: obtenção e atividade <i>in vitro</i> | 66 |
| 4.2 | Frações alcalóidicas: obtenção e atividade <i>in vitro</i> | 73 |
| 4.3 | Alcaloides isolados: obtenção e atividade <i>in vitro</i> | 76 |
| 4.4 | Efeito do alcaloide indólico de <i>A. panurensis</i> em <i>Leishmania amazonensis</i> 82 | |
| 4.4.1 | O alcaloide indólico 3-metoxi-2-oxa-4,10b-diaza-1,3,6a,10c-tetrahydrofluoranthano-3,5-diol induz alterações morfológicas em <i>L. amazonensis</i> | 84 |
| 4.4.2 | O alcaloide 3-metoxi-2-oxa-4,10b-diaza-1,3,6a,10c-tetrahydrofluoranthano-3,5-diol induz autofagia em <i>L. amazonensis</i> | 87 |
| 4.4.3 | Alterações metabólicas após o tratamento: Formação de corpos lipídicos, Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e alteração no potencial mitocondrial | 89 |
| 5. | Conclusões - Capítulo I..... | 94 |
| | CAPÍTULO II | 95 |
| 1. | OBJETIVO DO CAPÍTULO | 96 |
| 1.1 | Objetivo geral | 96 |
| 1.2 | Objetivos específicos | 96 |
| 2. | REFERENCIAL TEÓRICO | 98 |
| 2.1 | Ciclo de divisão celular..... | 98 |
| 2.2 | Ciclo celular em Tripanosomatídeos | 101 |
| 2.3 | Proteínas quinases como alvo terapêutico..... | 104 |
| 2.3.1 | Proteínas quinases de <i>Leishmania</i> | 105 |
| 2.4 | <i>Leishmania</i> : Manipulação Genética | 107 |
| 2.5 | Superexpressão de proteínas | 108 |
| 3. | MATERIAL E MÉTODOS | 117 |

| | |
|--|-----|
| 3.1 Bioinformática | 117 |
| 3.1.1 Obtenção e manipulação das sequências de DNA..... | 117 |
| 3.2 Cultura de bactérias – métodos empregando <i>E. coli</i> | 117 |
| 3.2.1 Transformações..... | 118 |
| 3.2.2 Cultura e armazenamento de bactérias..... | 118 |
| 3.2.3 Preparação dos plasmídeos de <i>E. coli</i> | 118 |
| 3.3 Biologia molecular..... | 120 |
| 3.3.1 Extração de DNA..... | 120 |
| 3.3.2 Quantificação e pureza do DNA | 120 |
| 3.3.3 Sequenciamento de DNA | 120 |
| 3.3.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)..... | 120 |
| 3.3.5 Enzimas de restrição | 121 |
| 3.3.6 Eletroforese em gel de agarose..... | 122 |
| 3.6.7 Recombinação de DNA - Geração dos plasmídeos..... | 122 |
| 3.6.8 Precipitação do DNA..... | 125 |
| 3.7 Métodos Cultura de <i>Leishmania mexicana</i> | 125 |
| 3.7.1 Cultura de formas promastigotas de <i>Leishmania mexicana</i> | 125 |
| 3.7.2 Cultura de formas amastigotas axênicas de <i>L. mexicana</i> | 125 |
| 3.7.3 Determinação da densidade celular..... | 126 |
| 3.7.4 Armazenamento de <i>Leishmania</i> | 126 |
| 3.7.5 Transfecção e seleção dos clones..... | 126 |
| 3.7.6 Indução com tetraciclina | 127 |
| 3.7.7 Análise do ciclo celular por quantificação de DNA em citometria de fluxo | 127 |
| 3.8 Métodos bioquímicos | 127 |
| 3.8.1 Obtenção dos extratos proteicos | 127 |
| 3.8.2 SDS-PAGE | 128 |
| 3.8.3 Western blotting..... | 128 |
| 4. RESULTADOS E DISCUSSÃO | 130 |
| 4.1 Superexpressão de proteína quinase dependente de ciclina 3 (CRK3) em promastigotas | 130 |
| 4.2 Superexpressão de ciclina A em amastigotas de <i>L. mexicana</i> | 144 |
| 4.3 Aperfeiçoamento do sistema de superexpressão induzida por tetraciclina em <i>L. mexicana</i> | 148 |

| | | |
|-------|---|-----|
| 4.3.1 | <i>Geração dos plasmídeos pRIB-T7 e pRIB-TetR</i> | 150 |
| 4.3.2 | <i>Transfecção e geração da cepa co-expressando T7TetR</i> | 154 |
| 5. | CONCLUSÃO DO CAPÍTULO..... | 157 |
| 3. | CONCLUSÃO FINAL..... | 158 |
| | REFERÊNCIAS..... | 159 |
| | APÊNDICE A..... | 189 |
| | Capítulo I – Resultados fitoquímicos complementares do capítulo I..... | 189 |
| | APÊNDICE B..... | 193 |
| | <i>Atividade in vitro e in vivo dos extratos etanólicos de Paraia bracteata e Rhodostemonodaphne Peneia</i> | 194 |
| | ANEXO I - Parecer do Comitê de Ética da Universidade Estadual de Maringá . | 202 |
| | APÊNDICE C..... | 205 |
| | Artigo publicado com partes dos resultados apresentados na tese. | 205 |

1. INTRODUÇÃO

As doenças infecciosas têm impacto significativo na saúde humana. Grande parte dessas é causada por parasitos e são classificadas como doenças negligenciadas, as quais afetam principalmente países subdesenvolvidos e em desenvolvimento (DE SOUZA, 2010). A doença de Chagas e a Leishmaniose são exemplos de doenças negligenciadas com alta taxa de morbidade anual nos países endêmicos (WHO, 2015). Até o momento, não existe vacina para tais parasitoses e os tratamentos apresentam severos efeitos colaterais. Por muito tempo, as pesquisas relacionadas a essas doenças eram restritas, visto que as regiões endêmicas tem perfil de baixa renda, não sendo atraentes financeiramente para o mercado farmacêutico (NDJONKA et al., 2013; DE SOUZA, 2010).

A busca por novos fármacos se baseia em diferentes abordagens: varredura fenotípica, varredura baseada no alvo e reposicionamento fármacos já existentes (MIGNANI et al., 2016). Cada uma das abordagens tem um custo e tempo diferentes até a obtenção do novo fármaco. Por exemplo, na varredura fenotípica e na busca por alvos moleculares, o custo é de aproximadamente 1 bilhão de dólares e o tempo médio de aprovação pelo FDA (*Food and Drug Administration*) é de 10 a 12 anos. Já a combinação de uma ou mais abordagens pode reduzir o tempo e o custo do processo (MIGNANI et al., 2016). Na abordagem baseada na varredura fenotípica o organismo modelo é utilizado como um todo a fim de identificar substâncias que induzam alterações no fenótipo deste sem, no entanto, definir o exato mecanismo de ação. Geralmente utilizam-se técnicas de alto rendimento que permitem avaliar milhares de substâncias e detectar diferentes fenótipos simultaneamente (FIELD et al., 2017). Já para a abordagem se baseando no alvo, é necessário definir a molécula que seria um promissor alvo de substâncias. No caso de tripanosomatídeos, os maiores sucessos na descoberta de novas substâncias foram de abordagens fenotípicas. Isso se deve ao fato da falta de conhecimento sobre todos os possíveis alvos nestes organismos (NAGLE et al., 2014; MIGNANI et al., 2016; FIELD et al., 2017).

Na busca por novas substâncias bioativas, produtos naturais provenientes de plantas são considerados promissoras fontes de novas moléculas. Atualmente, muitos fármacos utilizados são derivados diretamente de produtos naturais ou

sintetizadas a partir de estruturas descobertas em metabólitos secundários (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015; FIELD et al., 2017).

A Amazônia tem um importante papel nessa busca por novos fármacos. Além da sua importância ecológica global, a região é uma fonte rica em espécies com uso medicinal (CARNEIRO et al., 2008). Apesar de a medicina tradicional existir no Brasil e inúmeras plantas serem utilizadas no tratamento de doenças, poucas pesquisas avaliam as propriedades farmacológicas e tóxicas da nossa flora (MACIEL et al., 2002; CARNEIRO et al., 2008). Um dos poucos exemplos de medicamento extraído da flora brasileira no mercado atual é o fitoterápico anti-inflamatório Acheflan® obtido de *Cordia verbenacea* (BARREIRO; BOLZANI, 2009).

Dentre as espécies da flora brasileira com alto potencial terapêutico, encontram-se as pertencentes à família *Lauraceae*. Essa família é rica em metabólitos secundários com reconhecida atividade biológica, como alcaloides aporfínicos e benzilisoquinolínicos, neolignanais, lignanas, flavonoides, sesquiterpenos e pironas (GARCEZ et al., 2011; CUSTÓTIDO; DA VEIGA-JUNIOR, 2014). Dentre as propriedades farmacológicas já descritas para diversos gêneros de *Lauraceae*, estão atividades antioxidante, antiparasitária e antitumoral (TEMPONE et al., 2005; GARCEZ et al., 2011; YAMAGUCHI; ALCÂNTARA; VEIGA JUNIOR, 2012; ALCÂNTARA; YAMAGUCHI; VEIGA JUNIOR, 2013; YAMAGUCHI et al., 2013; CUSTÓTIDO; DA VEIGA-JUNIOR, 2014; SHEN et al., 2014).

Tendo em vista o cenário de grande riqueza da flora Amazônica e escassez de substâncias efetivas para o tratamento de doença de Chagas e leishmaniose, o presente trabalho teve como objetivo avaliar a atividade e os mecanismos de ação de frações alcaloídicas e de alcaloides isolados de *Lauraceae* da Amazônia em tripanosomatídeos. Além disso, combinado com a varredura fenotípica, utilizou-se a teoria da abordagem por busca de alvos para gerar um modelo de superexpressão induzida em *L. mexicana*, que será utilizado para busca de novos fármacos.

Com as duas abordagens na descoberta de novos fármacos, foi possível isolar um alcaloide indólico com potencial anti-*Leishmania* e gerar um modelo de superexpressão induzida como ferramenta para novos ensaios. Dessa forma, a

tese contribuiu para o conhecimento da flora amazônica, descrição da atividade de alcaloide em tripanosomatídeos e na geração de uma nova ferramenta molecular.

O projeto de tese foi executado em 4 principais etapas: coleta e preparação de extratos, atividade biológica, isolamento de alcaloides e superexpressão como ferramenta de busca por fármacos. Os resultados estão apresentados em dois capítulos: **Atividade e mecanismos de ação de alcaloides de *Lauraceae* da Amazônia em tripanosomatídeos** e **Geração do modelo de superexpressão como ferramenta na busca de novos fármacos frente à *L. mexicana***

2. OBJETIVO GERAL

Avaliar o potencial de extratos de *Lauraceae* da Amazônia como fonte de novos alcaloides com atividade contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania* spp. e utilizar abordagens moleculares de expressão gênica para geração de nova ferramenta na busca por novos fármacos anti-tripanosomatídeos.

CAPÍTULO I

Atividade e mecanismos de ação de alcaloides de *Lauraceae* da Amazônia em tripanosomatídeos

Os resultados apresentados neste capítulo focam na extração e isolamento de alcaloides de espécies da família *Lauraceae* e a atividade frente a *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis*. Parte dos resultados deram origem a um artigo:

Fernandes, Nilma; DESOTI, V.; NAKAMURA, C. V.; VEIGA JUNIOR, V. F. Atividade *in vitro* de extratos de *Ocotea* em *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis*. **Scientia Amazonia**, v. 5, p. 93, 2016.

1. OBJETIVO DO CAPÍTULO

1.1 Objetivo geral

Avaliar a atividade de extratos, frações alcaloídicas e alcaloides isolados de *Lauraceae* da Amazônia quanto aos efeitos e mecanismos em *T. cruzi* e *Leishmania* spp.

1.2 Objetivos específicos

- Definir e coletar espécies de diferentes gêneros de *Lauraceae* da Amazônia
- Obter extratos etanólicos de diferentes espécies de *Lauraceae* da Amazônia;
- Obter frações alcaloídicas de folhas e galhos das espécies com maior potencial anti-tripanosomatídeo;
- Avaliar o efeito dos extratos e frações em *Trypanosoma cruzi*;
- Avaliar o efeito dos extratos em *Leishmania amazonensis*;
- Isolar os alcaloides majoritários das espécies com maior potencial anti-tripanosomatídeo;
- Definir mecanismos do alcaloide indólico isolado em *L. amazonensis*

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Família *Lauraceae*

A família *Lauraceae* apresenta distribuição tropical e subtropical, principalmente nas florestas da América (Figura 1) (CHANDERBALI *et al.*, 2001). A família inclui aproximadamente 50 gêneros e 3000 espécies, sendo que no Brasil encontra-se 16% dessa diversidade, com 25 gêneros e 400 espécies distribuídos na Mata Atlântica, florestas da região sul e floresta Amazônica. (BARROSO *et al.*, 2007; SOUZA; LORENZI, 2005). De acordo com recente publicação, é a quarta família com maior número de espécies (BEECH *et al.*, 2017).

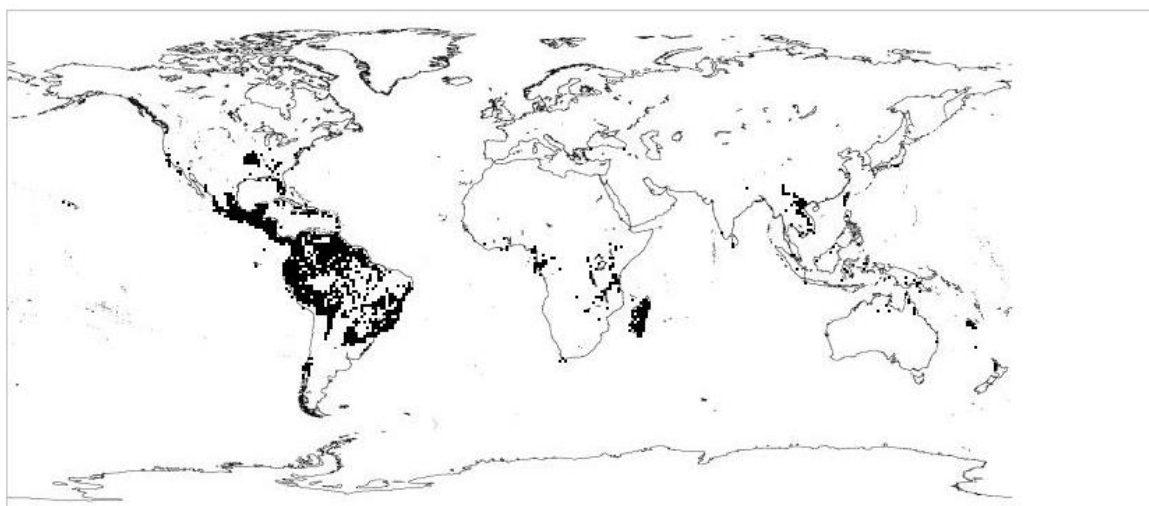


Figura 1 - Distribuição das espécies de *Lauraceae* Juss. A espécie tem predominância das espécies na América do Sul. Missouri Botanical Garden (acesso em abril de 2017).

Os 25 gêneros registrados como nativos do Brasil são: *Aiouea*, *Anaueria*, *Aniba*, *Beilschmiedia*, *Cassytha*, *Cinnamomum*, *Cryptocaria*, *Dicypellium*, *Endlicheria*, *Kubitzkia*, *Licaria*, *Mezilaurus*, *Misanteca*, *Nectandra*, *Ocotea*, *Paraia*, *Persea*, *Phoebe*, *Phyllostemonodaphne*, *Pleurothyrium*, *Rhodostemonodaphne*, *Sextonia*, *Systemonodaphne*, *Urbanodendron* e *Williamdendron*. Outros dois foram introduzidos devido à importância econômica como *Laurus* e *Litsea*. Dentre estes, 13 são encontrados na Reserva Ducke, em Manaus (MARQUES, 2001; SOUZA; LORENZI, 2005).

Várias espécies da família *Lauraceae* tem grande importância comercial e são amplamente utilizadas na indústria, produção de medicamentos, fragrâncias, cosméticos e alimentação. Algumas espécies têm uso restrito a comunidades tradicionais com conhecimentos empíricos sobre atividades biológicas e utilidades. Devido à exploração econômica e diversidade das espécies, observa-se grande número de *Lauraceae* ameaçadas de extinção (VICENTINI *et al.*, 1999; MARQUES, 2001; CUSTÓDIO *et al.*, 2012).

Produtos naturais obtidos de espécies de *Lauraceae* atingiram grande importância comercial, como o óleo essencial de *Aniba rosaeodora*, um excelente fixador de perfumes devido à composição rica em linalol (ZANIN; LORDELLO, 2007). Várias neolignanas são descritas para a família e têm sido usadas para o desenvolvimento de novos fármacos (APERS; VLIETINCK; PIETERS, 2003). Ainda, pode-se destacar importantes atividades biológicas da família como as atividades antioxidante, anti-helmíntica, antiviral, antitumoral, antimalárica, anti-esquistossomótica e anti-tripanosomatídeos (KINGSTON; NEWMAN, 2012; YAMAGUCHI; ALCÂNTARA; VEIGA JUNIOR, 2012; NGUYEN *et al.*, 2016; SOUZA CONCEIÇÃO *et al.*, 2017).

As espécies de *Lauraceae* também são conhecidas por serem ricas em alcaloides (GOTTLIEB, 1972a), com aproximadamente 300 descritos, sendo predominantes os alcaloides indólico, benzilisoquinolínico e aporfinóides (GOTTLIEB, 1972b; CORDELL; QUINN-BEATTIE; FARNSWORTH, 2001; CUSTÓDIO; DA VEIGA-JUNIOR, 2014). Como revisado por Grecco *et al.* (2016), somente no gênero *Nectandra*, foram descritos mais de 30 alcaloides, sendo alguns deles relacionados com diversas atividades biológicas (GRECCO *et al.*, 2016).

SHEN e colaboradores (2014) utilizaram métodos de análise em larga escala para avaliar extratos etanólicos de várias espécies de *Lauraceae* quanto às propriedades quimiopreventivas. Os autores sugeriram o mecanismo de ação pelo qual os extratos, incluindo os obtidos de *Litsea garrettii*, *Cinnamomum chartophyllum*, *C. mollifolium*, *C. camphora* var. *linaloolifera* e *C. burmannii*, exercem atividade antioxidante: os extratos aumentam a expressão de Nrf2 (*Nuclear factor-erythroid 2-related factor 2*) e genes relacionados, aumentando o nível intracelular de glutatona e, conseqüentemente, a capacidade da manutenção do equilíbrio redox. Além disso, observou-se efeito protetor em linhagem de células

pulmonares (HBE, *Human Bronchial Epithelial Cells*) quando estas foram co-incubadas com H₂O₂ e os extratos. Os resultados demonstram a validade do método de purificação guiada e elucidação estrutural das substâncias responsáveis pela atividade (SHEN et al., 2014).

2.2 Produtos Naturais

O uso de produtos naturais obtidos de plantas, fungos e microrganismos tem sido a base de tratamentos médicos nas civilizações chinesas, indianas e egípcias por milhares de anos e continua como base dos tratamentos médicos no mundo ocidental (HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015; NEWMAN; CRAGG, 2016). No Brasil, diversas plantas conhecidas popularmente como medicinais podem ser encontradas em feiras e mercados populares (TEMPONE *et al*, 2005).

A análise das novas drogas aprovadas pelo FDA entre 1981 e 2014 revelou que 25% dos medicamentos eram produtos naturais ou derivados (NEWMAN; CRAGG, 2016). Uma busca sobre “produtos naturais” na base de dados *ClinicalTrial* resulta em 1.954 estudos relacionados aos produtos naturais. A figura 2 representa o mapa de distribuição dos ensaios clínicos utilizando produtos naturais no mundo na data da busca. Vale ressaltar que grande parte dos estudos cadastrados se concentram nos EUA e Europa, praticamente inversamente proporcional a diversidade biológica de fauna e flora.

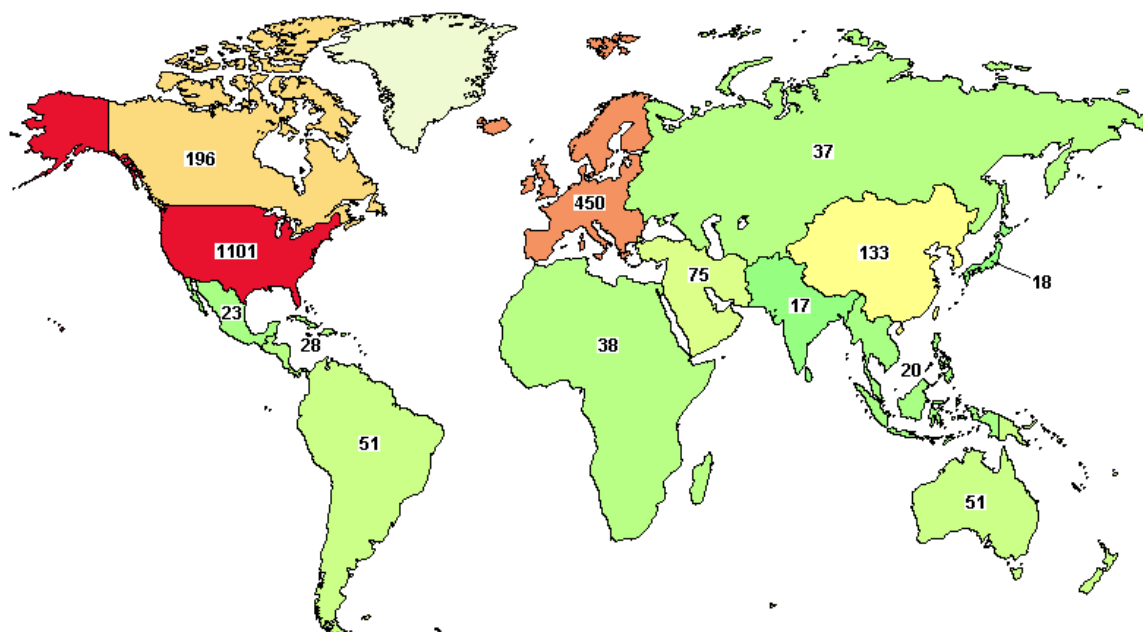


Figura 2- Mapa de distribuição de ensaios clínicos relacionados aos produtos naturais em todo mundo. Os números indicam a quantidade de estudos em cada região no momento da busca (Fonte: <https://ClinicalTrials.gov>, acesso em Abril de 2017).

Aproximadamente 60% das substâncias em ensaios clínicos estão agrupadas em apenas dez famílias taxonômicas: *Fabaceae*, *Asteraceae*, *Apiaceae*, *Rosaceae*, *Solanaceae*, *Poaceae*, *Lamiaceae*, *Rutaceae*, *Brassicaceae* e *Amaryllidaceae* (SHARMA; SARKAR, 2013). Substâncias isoladas a partir de produtos naturais ou fitoterápicos tem sido testados para Alzheimer, diabetes, câncer e doenças infecciosas (CALCUL *et al*, 2012; COPP; PEARCE, 2007; HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015; IZUMI *et al*, 2011; KUO *et al*, 2009; LAZARIN-BIDÓIA *et al*, 2013; SALEEM *et al*, 2010; VOLPATO *et al*, 2013).

Analisando os dados disponíveis, notamos que a maioria das espécies de plantas não foram sistematicamente investigadas na busca por substâncias bioativas, inclusive espécies com reconhecido uso em medicina tradicional necessitam de maior exploração. Além disso, muitos dos trabalhos não tem continuidade quanto aos mecanismos de ação das moléculas, sendo em sua maioria, somente descrição das atividades (SHARMA; SARKAR, 2013; HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015).

As pesquisas com produtos naturais visam compreender a produção e atuação de substâncias bioativas pelas espécies com intuito de aplicá-las em prol

da humanidade. Sendo assim, é importante não somente a possibilidade de encontrar novos fármacos, mas entender as alterações celulares que ocorrem na presença de tais substâncias.

2.3 Alcaloides

O uso de plantas contendo alcaloides por civilizações antigas é confirmado por registros arqueológicos e datam de 2000 BC (ANISZEWSKI, 2007) e ainda hoje observa-se uso empírico de alcaloides para tratamentos de diversas patologias. Já o isolamento e purificação dessas moléculas começou no século 19, com o isolamento de morfina a partir da *Papaver somniferum*. Em seguida, vários outros alcaloides foram isolados, como a quinina e a cafeína (AMIRKIA; HEINRICH, 2014). Apesar da utilização há milênios e da existência de aproximadamente 20 mil substâncias listada como alcaloides, essa classe é subrepresentada no mercado. Comparativamente com o mercado de fármacos sintéticos e semissintéticos e outras moléculas, os alcaloides são praticamente ausentes (AMIRKIA; HEINRICH, 2014).

Os alcaloides são um amplo e diverso grupo de metabólito secundário de origem animal e vegetal, caracterizados pela presença de pelo menos um átomo de nitrogênio (DEWICK, 2002). A classificação dos alcaloides é baseada na natureza da estrutura nitrogenada, ou seja, na sua biossíntese. A maioria deles é derivada de aminoácidos, como fenilalanina, tirosina, ácido antranílico, triptofano, arginina, lisina, histidina e ácido nicotínico (DEWICK, 2002; SPRINGOB; KUTCHAN, 2009; CUSHNIE; CUSHNIE; LAMB, 2014). No entanto, os alcaloides podem ser derivados de outros precursores tais como purinas e terpenos, os quais se tornam aminados após a síntese do esqueleto principal, sendo denominados pseudoalcaloides. Os alcaloides são usualmente multifuncionais, ou seja, um único alcaloide pode possuir mais de um grupo funcional com mais de uma função biológica (WINK, 2008; AMIRKIA; HEINRICH, 2014; URRÁ; ARAYA-MATURANA, 2015; OGUNGBE; SETZER, 2016; HAMID; RAMLI; YUSOFF, 2017).

As propriedades tóxicas dos alcaloides podem ser geradas por diversos mecanismos de ação, incluindo o bloqueio ou despolimerização do citoesqueleto, como o taxol e a colchicina. Esses dois alcaloides têm como alvo tubulinas, no entanto, atuam de formas diferentes. O taxol foi isolado de *Taxus brevifolia* após uma varredura de centenas de plantas (WANI *et al.*, 1971). Nos Estados Unidos, a FDA aprovou o uso do taxol no tratamento de câncer de ovário em 1992. Atualmente, é um dos fármacos anticâncer mais importantes e amplamente utilizado no tratamento de câncer de ovário, de mama, pulmão e tratamento da síndrome de Kaposi (MUKHTAR; ADHAMI; MUKHTAR, 2014; URRÁ; ARAYA-MATURANA, 2015). Seu mecanismo de ação envolve a ligação à β -tubulina, promovendo a estabilização dos microtúbulos e bloqueio da mitose. Já a colchicina, isolada de *Colchicum autumnale*, inibe a polimerização dos microtúbulos (WINK, 2008; GHERBOVET *et al.*, 2014).

Outros alcaloides considerados agentes inibidores de microtúbulos, como a colchicina, são os alcaloides da vinca. Esses foram isolados das folhas de *Catharanthus roseus* (L.) G. Don (*Vinca rosea*). Após a descoberta da atividade antimitótica, aumentou-se o interesse nas pesquisas relacionadas ao mecanismo de ação e possível supressão dos efeitos colaterais, o que levou ao desenvolvimento de vários análogos semissintéticos, incluindo vindesina, vinorelbina e vinflunina. Apesar de esses alcaloides produzirem várias alterações químicas nas células e tecidos, a principal toxicidade é exercida pela interação com a tubulina e a alteração na função dos microtúbulos (MUKHTAR; ADHAMI; MUKHTAR, 2014; QIU *et al.*, 2014). Em altas concentrações os alcaloides da vinca destroem o fuso mitótico e despolimerizam os microtúbulos em células HeLa, resultando no bloqueio da divisão celular. Por outro lado, a vimblastina em baixas concentrações (0,8 nmol/L) não despolimeriza os microtúbulos, ainda assim bloqueia a mitose levando as células à morte por apoptose (JORDAN; WILSON, 2004).

Além dos microtúbulos, a molécula de DNA também pode ser alvo dos alcaloides. Os alcaloides lipofílicos berberina e sanguinarina são substâncias intercalantes que ficam pareadas aos nucleotídeos da dupla hélice de DNA. Essa intercalação interfere na replicação, no reparo e nas topoisomerasas da molécula. Já outros alcaloides como os pirrolizidínicos, os furoquinolínicos, o ácido

aristolóquico e cicasinias alteram o DNA via ligação covalente com as bases nitrogenadas, o que acarreta em mutações e formações de tumores (DEWICK, 2002; WINK, 2008; CONNOR, 2012).

Alguns alcaloides mimetizam estruturas de neurotransmissores podendo ter efeito antagonista ou agonista nos neuroreceptores (OGUNGBE; SETZER, 2016). Adicionalmente, outros importantes alvos são os canais iônicos, como os de sódio, potássio e cálcio. Por exemplo, o alcaloide reticulina bloqueia os canais de cálcio induzindo vasodilatação (MEDEIROS *et al.*, 2009). Outros alcaloides com importantes atividades farmacológicas são: codeína (analgésico), brucina (estimulante do sistema nervoso), reserpina (anti-hipertensivo), morfina (analgésico), glaziovina (ansiolítico), efedrina (antihipertensivo) quinina (antimalárico e antipirético) (MARZO *et al.*, 1978; MEDEIROS *et al.*, 2009; ELAMIN *et al.*, 2010; CONNOR, 2012; PARK *et al.*, 2012; AMIRKIA; HEINRICH, 2014; QIU *et al.*, 2014).

Quanto aos estudos buscando a atividade dos alcaloides frente a organismos patogênicos, tem-se atualmente ensaios bioguiados a fim de identificar e isolar novos alcaloides bioativos. Como resultado de alguns dos trabalhos realizados, pode-se citar a atividade antibacteriana, antifúngica e antiprotozária dessa classe de moléculas (KINGSTON; NEWMAN, 2012; AMIRKIA; HEINRICH, 2014; CUSHNIE; CUSHNIE; LAMB, 2014).

Estudos *in vitro* demonstraram atividade antiparasitária de alcaloides frente *Plasmodium falciparum*, *L. donovani*, *T. cruzi* e *T. brucei rhodesiensei*, como revisto por Ogungbe e Setzer (2016). O alcaloide piperina foi ativo *in vitro* frente à promastigotas de *L. donovani* (KAPIL, 1993). Criptolepina, o principal alcaloide de *Cryptolepis sanguinolenta* exibe alta toxicidade frente à *P. falciparum*, com grande potencial antimalárico (WRIGHT *et al.*, 2001). Outros trabalhos demonstraram atividade anti-*Leishmania* de vários alcaloides, incluindo xilopina, nornanteína, criptodorina, nornuciferina, lisicamina e laudosina, isolados de *Guatteria amplifolia* e *G. dumetorum* (*Annonaceae*). Os resultados demonstraram que xilopina, criptodorina, nornateína e nornuciferina foram ativos contra *L. mexicana* e *L. panamensis* (ANISZEWSKI, 2007; MONTENEGRO *et al.*, 2003). Adicionalmente, trabalhos recentes demonstraram atividade de alcaloides beta carbolínicos em *L. amazonensis* (VOLPATO *et al.*, 2013a; STEFANELLO *et al.*, 2014).

Embora a atividade biológica dos alcaloides seja descrita para várias doenças, somente 53 alcaloides estão atualmente em uso ou foram usados nos últimos anos na indústria farmacêutica. De acordo com Amirkia e Heinrich (2014), aproximadamente 0,002% do total de alcaloides descritos no banco de dados são comercializados. Nos últimos anos somente os alcaloides galantamina e taxol foram introduzidos no mercado (AMIRKIA; HEINRICH, 2014). Estes dados sugerem que, embora as estruturas desses metabólitos sejam conhecidas, os dados sobre os mecanismos de ação são fragmentados e incompletos. Tal conhecimento é necessário para compreender a função dos alcaloides nos alvos e definir a segurança da utilização dessas moléculas na quimioterapia de inúmeras patologias.

Existem limitações no uso de alcaloides e outros produtos naturais, visto a baixa produção nas plantas e as dificuldades de isolamento e purificação. A fim de contornar as limitações, novas tecnologias baseadas em engenharia genética de plantas e microrganismos vem sendo utilizadas para produção de alcaloides ou moléculas derivadas. Os avanços na área estão permitindo a reconstrução de vias metabólicas de plantas em organismos como *Escherichia coli* e *Saccharomyces cerevisiae* (EHRENWORTH; PERALTA-YAHYA, 2017). Alguns exemplos são a produção de artemisina semi-sintética utilizando levedura, método que garante alto rendimento e reduz os custos na produção do fármaco (PADDON; KEASLING, 2014); e a síntese e modificação do fármaco Topotecan, que inicia com o isolamento do alcaloide camptotecina a partir de plantas e passa por modificações enzimáticas e produção microbiana. Assim, pode-se gerar moléculas com propriedades terapêuticas aperfeiçoadas, como melhor absorção, distribuição, metabolismo, excreção e toxicidade (EHRENWORTH; PERALTA-YAHYA, 2017). Além disso, a produção de alcaloides por vias metabólicas em microrganismos permite o controle do ambiente, diminuindo as variáveis que alteram os metabólitos secundários de plantas, como sazonalidade.

2.4 Tripanosomatídeos

Os gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma* pertencem à família *Trypanosomatidae*. Os protozoários deste gênero são agentes etiológicos de

leishmanioses, doença de Chagas e tripanossomíase africana, respectivamente. Em conjunto, essas doenças afetam cerca de 22 milhões de pessoas em todo mundo (RODRIGUES; GODINHO; DE SOUZA, 2014). São protozoários eucariotos que tem uma organização estrutural clássica com organelas semelhantes às encontradas em células de mamíferos. No entanto, também apresentam organelas exclusivas da família. Vários estudos visam compreender a função destas organelas e definir a exata função biológica e as vias metabólicas. Já se sabe que algumas dessas vias metabólicas são diferentes das encontradas nas células dos hospedeiros, podendo ser alvo quimioterápico mais eficiente que os atualmente existentes (STUART et al., 2008; DE SOUZA, 2009; SOUZA; ATTIAS, 2010; RODRIGUES; GODINHO; DE SOUZA, 2014). Na figura 3, observamos as principais estruturas morfológicas de *Trypanosoma cruzi*, utilizando a forma epimastigota como modelo.

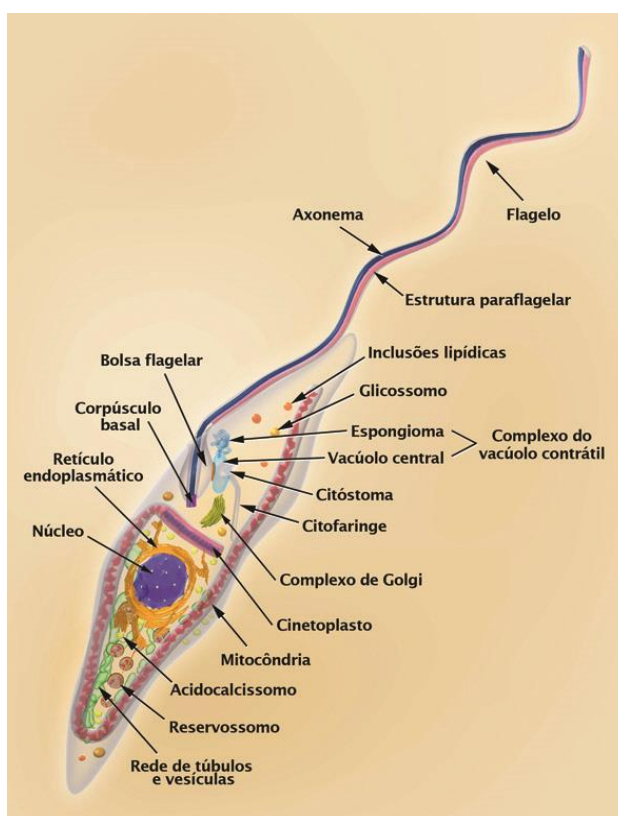


Figura 3 - Representação esquemática das organelas de epimastigota de *Trypanosoma cruzi*. A imagem é baseada em dados de microscopias óptica e eletrônica. Modificado de TEIXEIRA et al., 2011.

A membrana plasmática dos tripanosomatídeos apresenta glicocálix e microtúbulos subpeliculares. O glicocálix tem como principal função a interação entre o parasito e a superfície celular do hospedeiro mamífero ou o epitélio intestinal do inseto vetor. Já a membrana plasmática é dividida em três principais macro domínios: o corpo celular, o flagelo e a bolsa flagelar. Os macrodomínios apresentam micro domínios especializados para determinadas funções celulares, como bolsa flagelar na porção basal do flagelo; a zona de adesão do flagelo ao corpo celular e a região do citóstoma, observada em epimastigotas e amastigotas de *T. cruzi*, mas ausente em *Leishmania* e *T. brucei*. O domínio da membrana plasmática que circunda todo corpo celular está intimamente associado aos microtúbulos subpeliculares (DE SOUZA, 2009; SOUZA; ATTIAS, 2010; RODRIGUES; GODINHO; DE SOUZA, 2014).

Os microtúbulos subpeliculares formam um arranjo ao longo do corpo do protozoário, sendo responsável pelo formato do protozoário. Estão associados entre si, com a membrana plasmática e outras organelas, principalmente o retículo endoplasmático, via estruturas filamentosas, formando uma rede cortical em todo corpo dos tripanosomatídeos, exceto no domínio da bolsa flagelar. Fármacos que tipicamente despolimerizam microtúbulos de mamíferos, como taxol e nocodazol, não despolimerizam os microtúbulos subpeliculares. (SOUZA; ATTIAS, 2010; RODRIGUES; GODINHO; DE SOUZA, 2014). Ainda sobre o citoesqueleto dos tripanosomatídeos, análises bioquímicas, moleculares e do genoma dos parasitos demonstram que miosina, actina e proteínas relacionadas à actina como a cofilina, estão presentes na família, incluído espécies do gênero *Leishmania*, *T. cruzi* e *T. brucei*. Estas proteínas são importantes em diversos processos celulares, como motilidade, endocitose e divisão celular (SAHASRABUDDHE; BAJPAI; GUPTA, 2004; TAMMANA et al., 2010; CEVALLOS et al., 2011; DAI et al., 2011; RODRIGUES; GODINHO; DE SOUZA, 2014).

Outra característica importante dos tripanosomatídeos é o flagelo único que emerge a partir da bolsa flagelar, na região anterior do protozoário. É formado por nove pares de microtúbulos periféricos e dois pares centrais, exceto em amastigotas de *L. mexicana* com flagelos internalizados em padrão 9+0 (GLUENZ et al., 2010). A principal função do flagelo é a motilidade, no entanto, sabe-se que a estrutura também é responsável pela adesão à células dos hospedeiros. Paralelo

ao axonema, encontra-se uma rede filamentosa chamada de estrutura paraflagelar (PFR – *paraflagellar rod*) (FARINA et al., 1986). A PFR é composta por várias proteínas, sendo, em sua maioria, desconhecidas. Estudos anteriores demonstraram que mutações em duas proteínas dessa estrutura impedem a movimentação de promastigotas de *L. mexicana*, ou seja, essa rede é essencial para a motilidade e viabilidade celular (SANTRICH et al., 1997; DE SOUZA, 2009).

A morfologia das espécies com mais de um hospedeiro se altera durante as fases do complexo ciclo de vida. As formas se diferenciam entre si pelo formato da célula, posição em que o flagelo emerge e posição do cinetoplasto em relação ao núcleo (Figura 4).









| Forma evolutiva | | Definição |
|--|---|--|
| Promastigota |  | Forma alongada com cinetoplasto localizado na região anterior ao núcleo e flagelo livre na porção anterior da célula |
| Paramastigota (forma intermediária) |  | Forma alongada com cinetoplasto margeando o núcleo lateralmente |
| Opistomastigota |  | Forma alongada com cinetoplasto localizado na região posterior ao núcleo e flagelo que percorre todo o citoplasma e emerge na extremidade anterior. |
| Epimastigota |  | Forma alongada com cinetoplasto justanuclear e anterior ao núcleo e flagelo com pequena membrana ondulante e torna-se livre na região anterior. |
| Tripomastigota |  | Formato alongado com cinetoplasto na região posterior ao núcleo, onde também emerge o flagelo que forma uma extensa membrana ondulante tornando-se livre na região anterior. |
| Coanomastigota |  | Formato de pêra, com cinetoplasto anterior ao núcleo e flagelo livre. |
| Amastigota |  | Forma arredondada ou oval com flagelo curto e não externalizado. |
| Esferomastigota (forma de transição entre amastigota e formas flageladas) |  | Forma arredondada com cinetoplasto na porção anterior ao núcleo e flagelo circundando parcialmente a superfície do protozoário |

Figura 4 – Formas evolutivas encontradas na família *Trypanosomatidae*. As formas de maior interesse médico são as amastigotas e tripomastigotas, visto que são as formas no hospedeiro vertebrado. As formas presentes em *Leishmania* e *T. cruzi* serão discutidas em mais detalhes abaixo.

Os tripanosomatídeos tem mitocôndria única e ramificada (PAULIN, 1975). Nos eucariotos, a mitocôndria apresenta diversas formas e tamanhos. Em eucariotos superiores, a respiração mitocondrial ocorre via cadeia transportadora de elétrons (ETC - *electron transport chain*), através de cinco complexos enzimáticos presentes no interior das mitocôndrias: Complexo I- (NADH-ubiquinona oxidorreductase), Complexo II (succinato-ubiquinona desidrogenase), Complexo III (ubiquinol-citocromo c oxidase), Complexo IV (citocromo c oxidase) e Complexo V – F₀ F₁ -ATP sintase (NELSON; COX, 2008). Em protozoários, a extensão mitocondrial, o metabolismo e o número de cristas variam de acordo com o estágio do ciclo de vida, do ambiente e das fontes nutricionais (MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014; RODRIGUES; GODINHO; DE SOUZA, 2014). Por exemplo, em *T. cruzi*, o metabolismo mitocondrial é diferente entre as formas epimastigotas e tripomastigotas sanguíneas: as tripomastigotas exibem baixa taxa de consumo de oxigênio, aumento na produção de H₂O₂, maior atividade do complexo II e atividade reduzida do complexo IV (GONÇALVES et al., 2011).

Após o advento de microscopia eletrônica, analisou-se a mitocôndria de protozoários parasitas e foi observada uma região dilatada, mais densa com DNA mitocondrial. Essa região foi denominada de cinetoplasto e o DNA conhecido como kDNA. Em contraste com o DNA de outros eucariotos, o kDNA é composto de moléculas circulares denominadas mini e maxicírculos. Os maxicírculos são similares ao DNA mitocondrial de eucariotos superiores, codificando genes da cadeia respiratória e rRNA. Por outro lado, os minicírculos codificam RNA que atuam na criação dos transcritos de maxicírculos (MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014).

2.5 Tripanosomatídeos: descoberta de novos fármacos

As características únicas de tripanosomatídeos descritas acima podem ser utilizadas como alvos para fármacos. Os organismos desta família são, filogenicamente, os eucariotos mais distantes dos mamíferos, o que confere as diferenças entre os grupos (FIELD et al., 2017). A figura 5 mostra algumas características que podem ser exploradas para o tratamento de tripanosomíases.

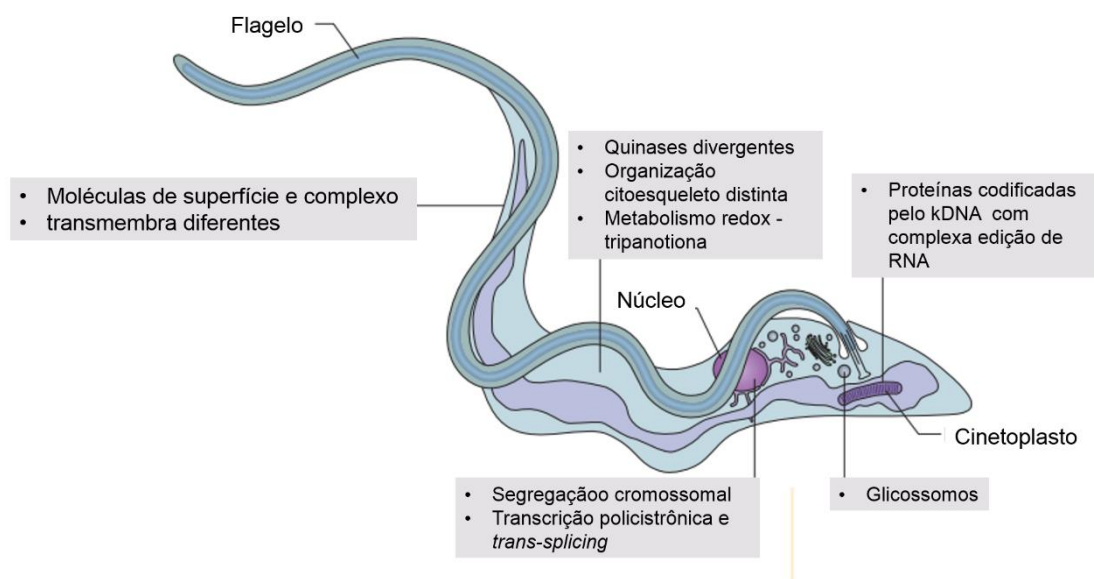


Figura 5 - Alvos moleculares em tripanosomatídeos. As características únicas celulares e metabólicas são alvos moleculares interessantes na busca por novos fármacos. Várias enzimas, como quinases e organelas como cinetoplasto e glicossomos seriam alvos seletivos, visto a divergências com os demais eucariotos. Modificado de FIELD et al., 2017.

Dentre as características distintas exemplificadas na figura 5, podemos citar a diferença na inibição de quinases de parasitos e hospedeiro, sugerindo que estas proteínas são um excelente alvo terapêutico. Além disso, muitas delas são essenciais ao tripanosomatídeos e inibidores se mostraram efetivos *in vitro* (GRANT et al., 2004; WALKER et al., 2011). A importância de quinases com alvo terapêutico é discutida no capítulo 2 da presente tese: “1.3 Proteína quinase como alvo terapêutico”. Ainda em consideração as características dos tripanosomatídeos, existem várias similaridades entre *T. cruzi*, *T. brucei* e *Leishmania* spp., sendo muitos mecanismos conservados entre as três linhagens. O que indica uma possibilidade de fármaco único para tratamento de tais doenças (KHARE et al., 2016). No entanto, até o momento, nenhuma substância desenvolvida ou em ensaios clínicos foca nestes alvos.

Recentemente foram avaliadas 3 milhões de substâncias e uma delas foi definida como um inibidor seletivo de proteassomo de *T. cruzi*, *Leishmania* spp. e *T. brucei*, e eliminou a parasitemia em camundongos, se mostrando efetiva para as três espécies. A substância, um azabenzoxazol, inibe o proteassomo por um mecanismo não competitivo, e não inibe a organela de células de mamífero, sendo

assim, um excelente candidato para nova forma de tratamento das tripanossomíases (KHARE et al., 2016).

Mesmo com vários trabalhos demonstrado atividade anti-tripanosomatídeos de diferentes classes de moléculas, poucas são as substâncias em ensaio clínico atualmente. Como revisto por Field e colaboradores (2017), vários estudos clínicos foram descontinuados devido à toxicidade ou eficácia e os que estão em andamento, não tem o mecanismo de ação completamente elucidado (FIELD et al., 2017).

Muitos métodos e técnicas são empregados para avaliar a resposta de tripanosomas ao tratamento com substâncias (ensaios fenotípicos). Na figura 6 estão exemplificados algumas dessas abordagens e as formas do ciclo de vida das espécies que são avaliadas. Observa-se que as diferentes técnicas diferem quanto à relevância, complexidade e custos. Geralmente, inicia-se a varredura de várias substâncias utilizando as formas mais fáceis de cultivo e com maior taxa de crescimento, como as encontradas no hospedeiro invertebrado (inseto). Em seguida são avaliadas as formas com relevância clínica e ensaios *in vivo* utilizando modelos animais, a fim de avaliar a farmacocinética da substância e a interação com o hospedeiro (Figura 6). O conjunto de técnicas utilizadas indica a concentração e o tempo necessários para matar o parasito e prever a situação em humanos. Devido as formas relevantes serem intracelular, no caso de *T. cruzi* e *Leishmania*, as substâncias devem ser capazes de atravessar múltiplas membranas para atingir o alvo durante os experimentos. No caso de *Leishmania*, são 3, já que as amastigotas se encontram dentro de vacúolos parasitóforo no interior de macrófagos. Já nos ensaios *in vivo*, utilizando modelos animais, existem ainda as barreiras do hospedeiro, tornando o experimento mais complexo (FIELD et al., 2017).

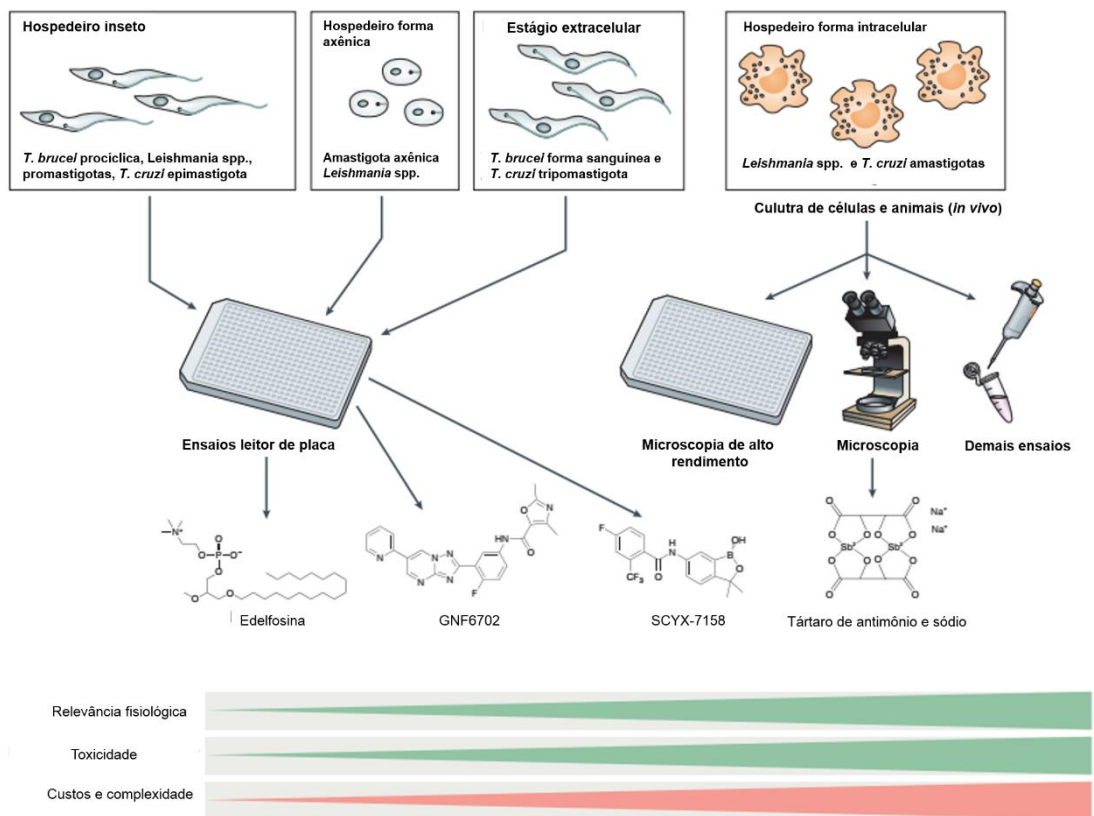


Figura 6 – Abordagens fenotípicas na descoberta de novas substâncias anti-tripanosomatídeos. Diferentes fases do ciclo de vida podem ser utilizadas para a varredura de substâncias ativas. As diferentes técnicas podem ser usadas dependendo da forma do ciclo de vida e da espécie analisada. Observa-se diferentes substâncias com atividades frente à tripanosomatídeos descobertas utilizando modelos *in vitro* e *in vivo*. Edelfosina (ACHERBERG; GERCKEN, 1987), GNF6702 (KHARE et al., 2016), SCYX-7158 (JACOBS et al., 2011) e Tártaro de amônio e sódio (PLIMMER; THOMSON, 1908). Modificado de FIELD et al., 2017.

Um exemplo de substância descoberta por ensaios fenotípicos atualmente em testes clínicos contra tripanossomíases é a fexinidazol (Figura 7).

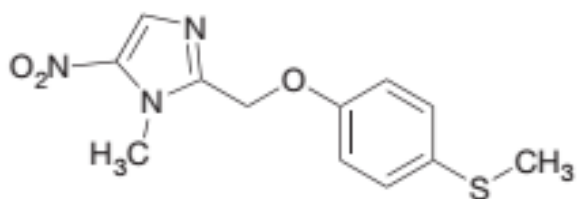


Figura 7- Estrutura do fexinidazol. Substância nitro heterocíclica em teste clínico contra tripanossomíases.

O fexinidazol é um 2-substituído 5-nitromidazol com primeiro relato de atividade frente a *T. brucei*. Embora apresente moderada atividade, com CI_{50} de $1\mu M$, é efetivo em modelos murinos nas fases aguda e crônica da doença. Os metabólitos de fexinidazol, sulfóxido e sulfona, são os compostos ativos após a administração da substância. Devido a atividade em *T. brucei*, a molécula também foi avaliada em *T. cruzi* e *Leishmania*, demonstrando atividade contra os parasitos. Atualmente, está em testes clínicos para Leishmaniose visceral, em combinação com miltefosina (fase 1) e fase 3 contra tripanossomíase africana (agente *T. brucei*). Infelizmente, a fase 2 dos testes clínicos para doença de Chagas foi descontinuada devido a necessidade de altas doses causar intolerância nos pacientes (BARRETT; CROFT, 2012; BAHIA et al., 2014; FIELD et al., 2017).

Os tratamentos disponíveis e alguns estudos de novas moléculas serão descritos para *T. cruzi* e *Leishmania* nos próximos tópicos.

2.6 *Leishmania* spp.

Os protozoários do gênero *Leishmania* são os agentes etiológicos da leishmaniose, doença infecciosa que afeta cerca de 1,3 milhões de pessoas e aproximadamente 30 000 mortes anualmente. Cerca de 30 espécies de *Leishmania* foram descritas, sendo que 21 destas são capazes de infectar humanos (WHO, 2015). Essas espécies são divididas em dois subgêneros: *Leishmania* e *Viannia*. As principais manifestações clínicas da leishmaniose são: visceral ou kala-azar,

cutânea, mucocutânea, difusocutânea e pós-kala-azar (COURA; DIAS, 2009; RODRIGUES; GODINHO; DE SOUZA, 2014). As áreas endêmicas de leishmanioses estão destacadas na figura 8.

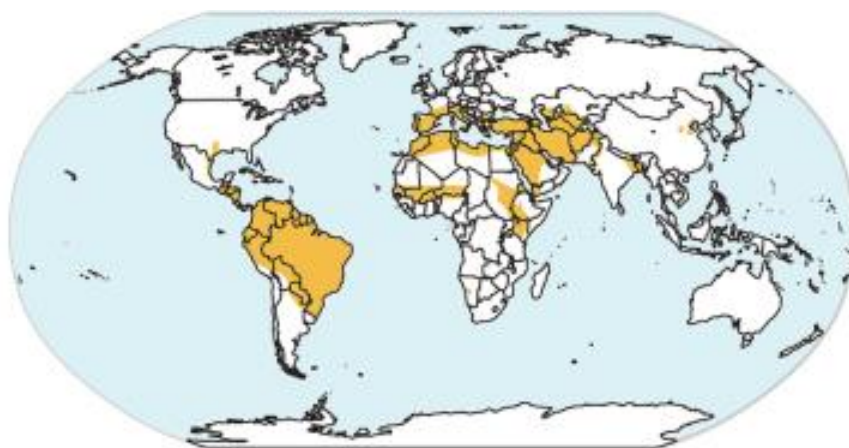


Figura 8 – Mapa de distribuição de leishmanioses no mundo. América do Sul, África e Europa central são as regiões mais afetadas (ESCH; PETERSEN, 2013)

Os parasitos do gênero *Leishmania* tem um complexo ciclo de vida heteroxeno (Figura 9), alternando entre promastigotas adaptados ao ambiente extracelular (intestino do inseto vetor) e amastigotas adaptados ao ambiente intracelular (interior dos macrófagos de mamíferos). As formas infectivas, promastigotas metacíclicas, são inoculadas no hospedeiro pela picada de fêmeas de flebotomíneos durante o repasto sanguíneo. Devido a presença de glicoconjugados na superfície do parasito, as promastigotas aderem a membrana plasmática dos macrófagos, iniciando o processo fagocítico. As promastigotas fagocitadas permanecem no interior dos macrófagos em vacúolos denominados vacúolos parasitóforos. Em seguida, se diferenciam em amastigotas, formas que sobrevivem em pH ácido dos vacúolos e se multiplicam por fissão binária. Após sucessivas divisões, o grande número de amastigotas acarreta em lise dos macrófagos, liberando os parasitos que infectam novos macrófagos ou são ingeridos pelo inseto vetor durante repasto. Em caso de serem ingeridas, as amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas no intestino do inseto. Em seguida, incia-se o processo de metacicloênese, no qual as promastigotas

procíclicas se diferenciam em formas promastigotas metacíclicas infectivas, dando início a novo ciclo (ESCH; PETERSEN, 2013; FIELD et al., 2017).

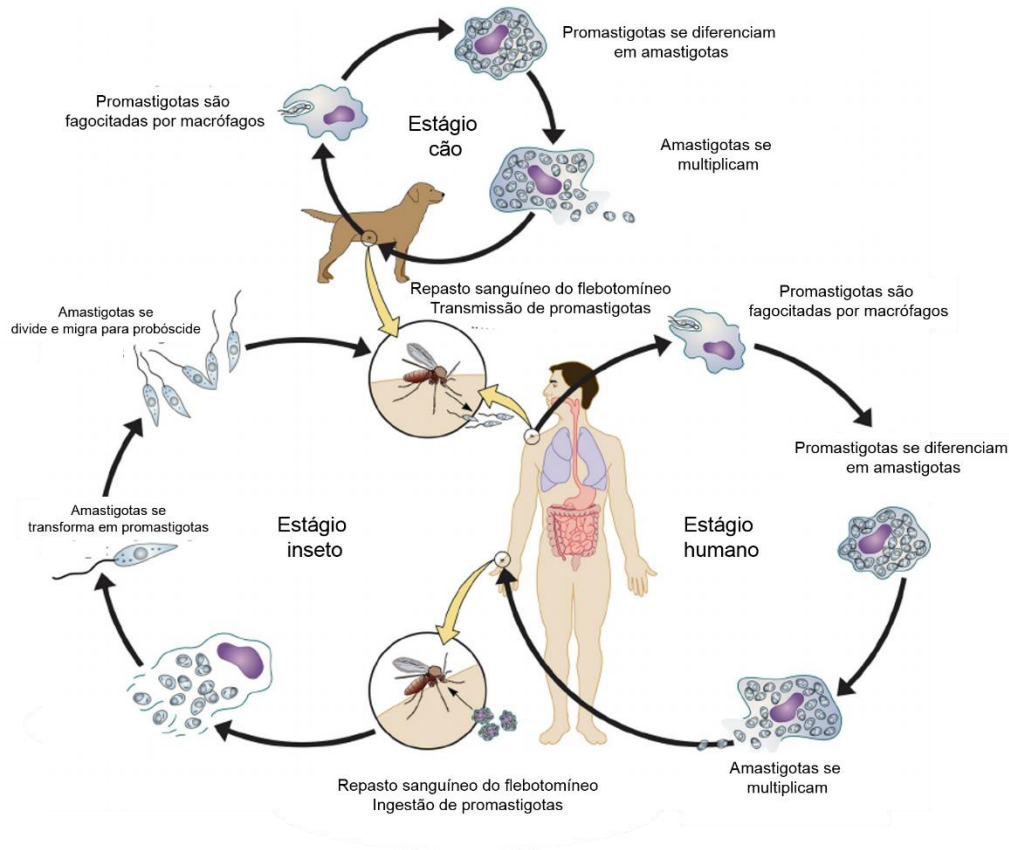


Figura 9- Desenho esquemático do ciclo de vida de *Leishmania* spp. Promastigotas infectivas metacíclicas são transmitidas pela picada da fêmea infectada de flebotomíneo; promastigotas metacíclicas são fagocitadas por macrófagos e no interior destes as formas promastigotas se diferenciam em amastigotas, se multiplicam e rompem os macrófagos, infectando outras células do hospedeiro. Os flebotomíneos ingerem macrófagos infectados e as formas amastigotas diferenciam-se em promastigotas procíclicas proliferativas, após o desenvolvimento, essa forma migra para a porção anterior do intestino como promastigotas metacíclicas, dando continuidade ciclo. Modificado de ESCH; PETERSEN, 2013.

O controle da leishmaniose é dificultado pelas limitações dos medicamentos usados no tratamento, pelo alto custo financeiro, bem como pela ausência de uma vacina eficaz (MURRAY et al., 2005; REITHINGER et al., 2007).

O tratamento de primeira escolha para leishmaniose consiste, desde 1950, na utilização de antimoniais pentavalentes (CROFT; COOMBS, 2003; CARDOSO et al., 2014), como o Pentostam® (Estibogluconato de sódio) e Glucantime® (antimoniato de meglumina). Ambos são pró-drogas que devem ser convertidas em antimoniais trivalentes para induzir atividade anti-*Leishmania*. Sugere-se que o

Pentostam inibe enzimas glicolíticas e a beta-oxidação de ácidos graxos em formas amastigotas de *Leishmania*. Apesar deste efeito, é necessário uso prolongado do medicamento, aumentando assim os riscos para o paciente e induzindo resistência do parasito à droga (CROFT; COOMBS, 2003; CARDOSO et al., 2014). Embora o mecanismo de ação de alguns antimoniais pentavalentes seja sugerido, o mecanismo exato ainda não foi completamente elucidado (Amato et al. 2000; WHO 2010). Entretanto, tem sido proposto que essa classe poderia formar um complexo com nucleotídeos, interferindo no metabolismo e inibindo a enzima topoisomerase do parasito (DEMICHELI et al., 2002). Efeitos tóxicos tem sido atribuídos ao uso desses medicamentos, como no coração, rins e pâncreas (Gasser et al. 1994; Zaghloul & Al-Jasser 2004; Croft 2006; Matoussi et al. 2007).

Como terapia alternativa em pacientes que não respondem ao tratamento convencional são utilizados outros fármacos, como anfotericina B, pentamidina, paromicina e miltefosina. A anfotericina B é um antifúngico derivado de *Streptomyces nodosus*, é utilizada como tratamento alternativo para leishmaniose quando existe resistência ao tratamento de primeira escolha. Este medicamento é capaz de interagir com o ergosterol na membrana celular de *Leishmania*, resultando em aumento da permeabilidade e consequente extravasamento de íons monovalentes (ORDÓÑEZ-GUTIÉRREZ et al., 2007). No entanto, pode causar severos efeitos colaterais, como nefrotoxicidade (PARTHA; DAS S; AUDDY RG, 2012).

Um dos maiores avanços no tratamento de leishmaniose foi o desenvolvimento do primeiro fármaco administrado por via oral, a miltefosina. Originalmente utilizado como antitumoral, está no mercado farmacêutico desde 2002. É um análogo de alquilfosfocolina e teve sua atividade anti-*Leishmania* rapidamente reconhecida (CROFT; COOMBS, 2003). Apesar de ser menos tóxica que as outras substâncias utilizadas, a miltefosina é altamente teratogênica, com mecanismo de ação envolvendo alterações no metabolismo lipídico e aumento na produção de óxido nítrico nas células do hospedeiro (FREITAS-JUNIOR et al., 2012). Além disso, a miltefosina modula receptores da superfície celular, altera o metabolismo de inositol, ativa fosfolipase C e proteínas quinases, resultando em respostas pró-apoptóticas (VERMA; DEY, 2004). Na figura 10 estão as estruturas dos fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses.

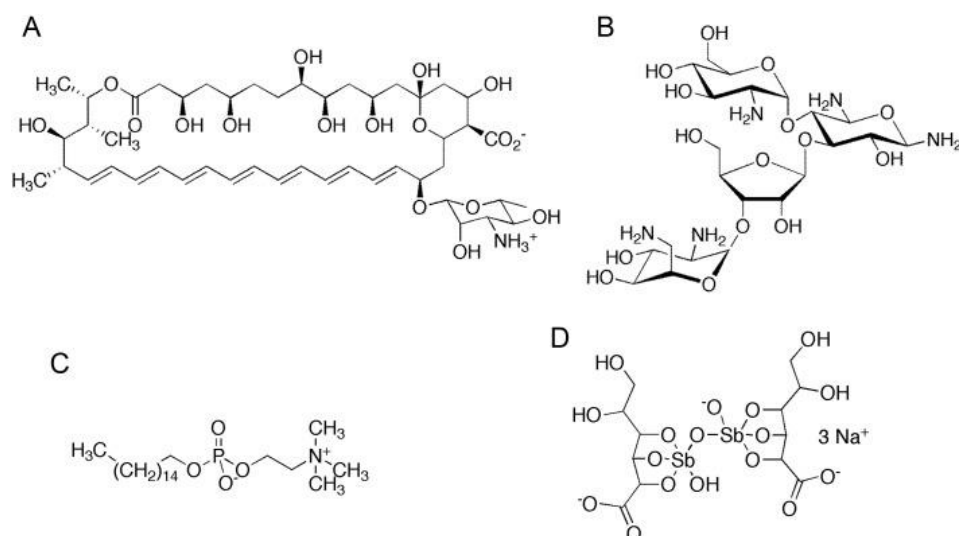


Figura 10 – Estrutura dos principais fármacos utilizados no tratamento de leishmanioses. (A) Anfotericina B; (B) Paromomicina; (C) Miltefosina e (D) Estibogluconato de sódio (BARRETT; CROFT, 2012).

Atualmente, na busca por novas drogas anti *Leishmania* as vias metabólicas vitais dos parasitos estão sendo consideradas como promissores alvos terapêuticos. Dentre estas, pode-se destacar as proteínas quinases (PK). Essas proteínas são responsáveis pela regulação de diferentes processos celulares como o controle transcricional, o ciclo e diferenciação celular, além de terem sido relatadas como alvo terapêutico para diversas doenças doenças cardiovasculares, Alzheimer e câncer (COHEN; ALESSI, 2013; CARDOSO et al., 2014; DURIEU et al., 2016).

Estudos envolvendo PKs de *Leishmania* sugerem que a inibição química ou nocaute de genes ciclina-dependente (CDK) e proteína-quinase ativada por mitógeno (MAPK) podem reduzir a viabilidade e inibir a proliferação de amastigotas intracelulares, sugerindo estas enzimas como potencial alvo terapêutico (CLEGHORN et al., 2011; DUNCAN et al., 2016). SANDERSON e colaboradores (2014) testaram inibidores de quinases já utilizadas para o tratamento anticâncer em *Leishmania* spp. e concluíram que estas substâncias podem ser potenciais candidatas para o tratamento de leishmanioses (SANDERSON; YARDLEY; CROFT, 2014).

Substâncias bioativas obtidas de plantas ricas em metabólitos secundários como saponinas, isoflavonas, flavonoides, alcaloides e sesquiterpenos estão descritas na literatura como imunomoduladores e são utilizados para o tratamento de diferentes patologias (PATWARDHAN; GAUTAM, 2005; SHUKLA; BAJPAI; KIM, 2014). Alguns produtos naturais isolados de diferentes classes tem demonstrado atividade anti*Leishmania in vivo* e *in vitro*, contra formas amastigotas e promastigotas em diferentes espécies de *Leishmania* (KYRIAZIS et al., 2013; CHOUHAN et al., 2014). Dentre estes metabólitos ativos descritos, os alcaloides são um bom exemplo. Alcaloides isoquinolínicos isolados da casca de *Annona spinescens* e *Guatteria foliosa* foram ativos frente a *L. donovani* e *L. amazonensis*. Plantas do gênero *Peschiera* contém os alcaloides conodurina e N-desmetilconodurina, e são ativos em formas promastigota de *L. braziliensis* e amastigota de *L. amazonensis* (CARDOSO et al. 2014).

2.7 *Trypanosoma cruzi*

T. cruzi é um protozoário parasita agente etiológico da doença de Chagas, descoberta em 1909 pelo brasileiro Carlos Chagas. Atualmente é endêmica em 21 países, principalmente na América Latina, com aproximadamente 8 milhões de pessoas infectadas em todo mundo e cerca de 10000 mortes por ano (WHO, 2015). As áreas endêmicas são destacadas no mapa abaixo (Figura 11).

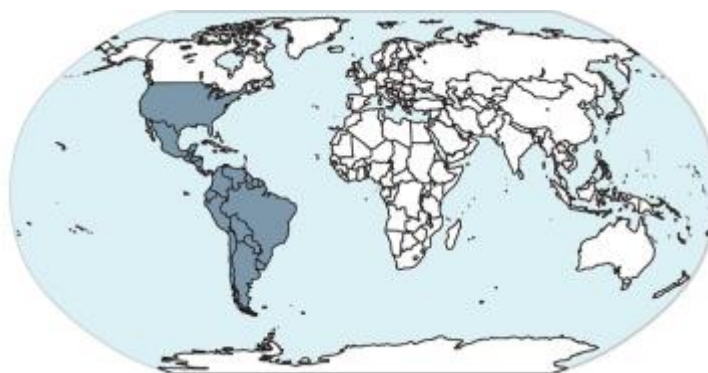


Figura 11 - Mapa de distribuição de doença de Chagas no mundo. América central e do Sul são as regiões mais afetadas. A América do norte apresenta casos acidentais de transmissão vetorial (ESCH; PETERSEN, 2013).

O parasito é transmitido aos humanos pelas fezes de insetos triatomíneos. No entanto, a transmissão não vetorial como transfusão sanguínea, transplante de órgãos, transmissão congênita e oral tem sido relatadas (STEINDEL et al., 2008; CASADEI, 2010). Diversos casos de transmissão oral foram descritos na região Amazônica, principalmente pela ingestão de comidas, frutas e sucos contaminados com o inseto vetor (VALENTE et al., 2009). A maioria dos casos foi de surtos em regiões do Amapá, Maranhão e Pará. Devido a ingestão de alta carga parasitária, estes casos apresentaram severa sintomatologia relacionada à fase aguda da doença de Chagas (COURA, 2015). Vale ressaltar que os casos na Europa, região não endêmica, estão aumentando devido a migração de pessoas (BASILE et al., 2011; FIELD et al., 2017).

As manifestações clínicas podem ser caracterizadas por uma fase aguda oligosintomática associada com baixas taxas de mortalidade. Ao controlar a parasitemia a fase crônica é iniciada. Somente após meses ou até mesmo décadas, aproximadamente 30-40% dos pacientes desenvolvem sintomas clínicos característicos, como distúrbios digestivos e cardíacos (BILATE; CUNHA-NETO, 2008; RASSI; RASSI; MARIN-NETO, 2010), sendo a principal causa de morte relacionada com a disfunção cardíaca (MONCAYO, 2003; WHO, 2002). Embora os mecanismos envolvidos na ativação de manifestações crônicas ainda não estejam esclarecidos, o balanço entre resposta imunológica do hospedeiro e a parasitemia, bem como a heterogeneidade genética de ambos, tem sido associados à progressão da doença (JUNQUEIRA et al., 2010). Sabe-se ainda que as populações de *T. cruzi* apresentam alto grau de variabilidade intraespecífica que podem estar associadas a sua adaptação, sobrevivência em diferentes hospedeiros e resistência a fármacos, tornando os sintomas mais ou menos brandos (MACEDO et al., 2001; CRUZ et al., 2015).

O parasito possui um ciclo biológico heteroxênico, passando por uma fase intracelular no hospedeiro vertebrado mamífero e outra extracelular no inseto vetor, como sumarizado na Figura 12. Durante o repasto sanguíneo, o inseto vetor (triatomíneo) ingere as formas tripomastigotas que entrarão em processo de diferenciação em formas imóveis no estômago do triatomíneo. Ao chegar ao intestino, estas se diferenciam em formas replicativas, as epimastigotas. Estas formas aderem às células intestinais através dos flagelos e, em seguida começam

o processo de metaciclogênese, o qual se diferenciarão em formas tripomastigotas metacíclicas infectivas. Ao terminar o processo, as tripomastigotas migram para o intestino posterior do vetor onde serão excretadas junto com as fezes. Após entrada no hospedeiro mamífero, as tripomastigotas metacíclicas podem infectar diferentes células como os fibroblastos, células epiteliais e macrófagos. Esta infecção é devido à interação de glicoconjugados da superfície do parasito com receptores da membrana plasmática do hospedeiro. Em seguida, inicia-se o estágio intracelular do ciclo de *T. cruzi*. As tripomastigotas se diferenciam em amastigotas, com formato ovoide e flagelo internalizado. Após a internalização, as formas amastigotas são liberadas no citoplasma das células, em seguida se diferenciam em tripomastigotas e são liberadas no espaço extracelular, onde podem infectar outras células ou serem sugadas durante o repasto sanguíneo do triatomíneo, dando início a um novo ciclo (ESCH; PETERSEN, 2013; RODRIGUES; GODINHO; DE SOUZA, 2014).

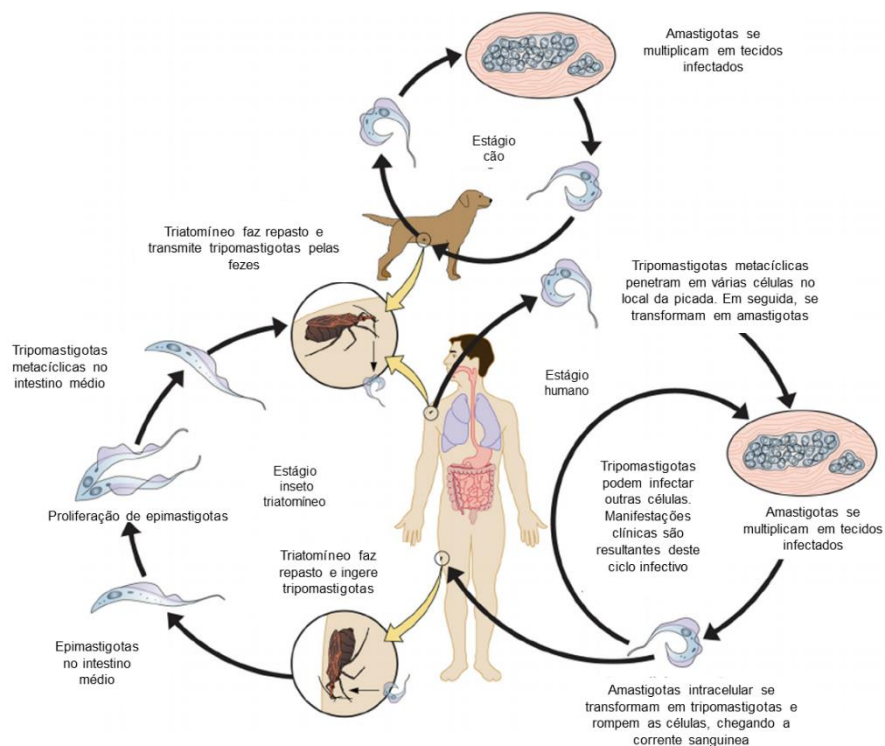


Figura 12 - Esquema ilustrativo do ciclo de vida de *T. cruzi*. As formas tripomastigotas metacíclicas de *Trypanosoma cruzi* são transmitidas pelas fezes do inseto vetor durante o repasto sanguíneo. Os parasitos infectam as células de tecidos e se diferenciam em formas amastigotas e se multiplicam. As formas amastigotas se diferenciam em tripomastigotas que são liberadas na corrente sanguínea e invadem outras células ou são ingeridas pelo vetor. No hospedeiro invertebrado se transformam em epimastigotas e se multiplicam no intestino médio. Por fim, tripomastigotas migram para o intestino posterior, dando continuidade ao ciclo. Modificado de ESCH; PETERSEN, 2013.

Os fármacos utilizados para o tratamento da doença de Chagas são o nifurtimox (Nx) e benznidazol (Bz) (Figura 13), ambos com ação frente a todas as formas parasitárias (MAYA et al., 2007). No Brasil, somente o Bz está disponível para tratamento. Este medicamento tem eficácia de aproximadamente 80% na fase aguda e apenas 10-20% na fase crônica da infecção (COURA; DE CASTRO, 2002; COURA; DIAS, 2009). Além da quimioterapia ter baixa eficácia na fase crônica da doença, ambas as drogas tem severos efeitos colaterais, levando muitas vezes, ao abandono do tratamento (VIOTTI et al., 2006; MAYA et al., 2010; RASSI; MARCONDES DE REZENDE, 2012; FIELD et al., 2017).

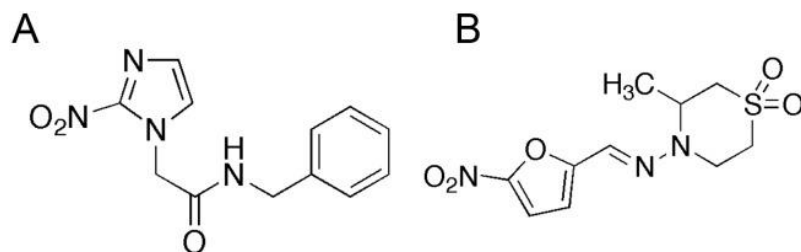


Figura 13 - Estrutura dos principais fármacos utilizados no tratamento de doença de Chagas. (A) Benznidazol; (B) Nifurtimox (BARRETT; CROFT, 2012).

Outro problema do tratamento para doença de Chagas é a resistência do protozoário ao quimioterápico. Bz e Nx atuam por meio da formação de radicais livres ou metabólitos eletrofílicos que afetam todas as macromoléculas do parasito (MAYA et al., 2010). Alguns estudos sugerem que a resistência de cepas de *T. cruzi* ao medicamento é devido a alteração na expressão de algumas enzimas como TcOYE, uma NADPH oxireductase que é sub expressa em cepas resistentes ao tratamento com Bz (MURTA et al., 2006; WILKINSON et al., 2008).

Apesar da baixa eficiência e diversos efeitos colaterais, ainda não existe tratamento mais efetivo que Bz e Nx. Vários compostos naturais ou sintéticos têm sido avaliados e demonstraram atividade tripanocida, como os medicamentos antifúngicos (cetoconazol e itraconazol), quinonas e derivados de quinoxalina (MAYA et al., 2010; RODRIGUES et al., 2014; COGO et al., 2015). Algumas substâncias inibidoras de síntese de esterol, de cisteína peptidases e do metabolismo de pirofosfato estão sendo utilizadas em ensaios clínicos para o tratamento de pacientes com Chagas (REITHINGER et al., 2007; URBINA, 2009). Recentemente, um estudo clínico utilizando posoconazol sozinho ou em combinação com benzonidazol foi finalizado. Apesar da terapia ter sido bem sucedida em ensaios com modelos murinos, os testes clínicos em pacientes não foram promissores (MOLINA et al., 2014). Ensaios clínicos com outra substância, fexinidazol, também foi interrompido devido à toxicidade (FIELD et al., 2017).

Com o intuito de descobrir novas moléculas para desenvolvimento de fármacos contra doença de Chagas e outras patologias, tem sido realizadas varreduras de substâncias bioativas provenientes de produtos naturais. Foram analisadas nos últimos anos aproximadamente 400 espécies de plantas na busca de compostos ativos contra *T. cruzi* (IZUMI et al., 2011). Segundo revisão de IZUMI

et al. (2011), várias espécies de plantas foram testadas contra as diferentes fases do ciclo de vida do protozoário. Dentre estas podemos citar as famílias *Anacardiaceae*, *Annonaceae*, *Asteraceae*, *Fabaceae*, *Malpighiaceae*, *Myrtaceae*, *Lauraceae* e *Sterculiaceae*. No caso de espécies da família *Lauraceae*, somente compostos extraídos de algumas espécies como *Laurus nobilis*, *Nectandra megapotamica*, *Nectandra glabrescens*, *Persea americana*, *Ocotea cymbarum* e *Ocotea lancifolia*, foram testados, no entanto, nem todos apresentaram atividade para todas as fases do ciclo de vida do parasito. Quanto aos alcaloides, estudos realizados utilizando alcaloides isolados de plantas da família *Rutaceae*, apresentaram atividades semelhantes às das drogas de referência Nx e Bz contra as formas epimastigotas (FOURNET et al., 2007; CABRAL et al., 2010; IZUMI et al., 2011; ALVES et al., 2012).

Embora existam estudos na busca de substâncias e estratégias políticas de saúde pública, o controle e erradicação da doença de Chagas ainda é um desafio (DIAS; PRATA; CORREIA, 2008; ABAD-FRANCH; SANTOS; SCHOFIELD, 2010; COURA; BORGES-PEREIRA, 2010).

3. MATERIAL E MÉTODOS

O material e métodos desta seção descreverá as etapas de fitoquímica e ensaios *in vitro* dos extratos, frações e substâncias isoladas. Os ensaios foram realizados com espécies da família *Lauraceae* frente aos protozoários parasitas *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis* e *L. mexicana*. As atividades propostas estão esquematizadas na figura abaixo.



Figura 14 – Representação esquemática das atividades das atividades realizadas nas três primeiras partes da tese, as quais englobam o captítulo I.

3.1 Análise fitoquímica

3.1.1. Obtenção do material vegetal

Foram utilizadas espécies pertencentes à família *Lauraceae* da região Amazônica brasileira. As espécies foram selecionadas a partir de dados obtidos no grupo de estudo Q-bioma e na literatura. Foram priorizadas espécies inéditas ou com potencial para produção de fármacos avaliados pelo grupo previamente. Os espécimes foram coletados na Reserva Florestal Ducke e Universidade Federal do Amazonas (UFAM). As espécies da Reserva Ducke foram catalogadas e

georeferenciadas durante o projeto Flora a Reserva Ducke. Foram utilizados os códigos e localização de cada uma das espécies coletadas fornecidas pelo Dr. Alberto Vicentini (VICENTINI, A., H. V. D. WERFF, 1999). Já as espécies coletadas na UFAM foram identificadas por Dr. Alberto Vicentini.

Foram utilizadas as folhas e galhos das plantas coletadas. As amostras foram limpas para remoção do material não vegetal e armazenadas sob refrigeração até o processamento. As espécies coletadas estão representadas no Quadro 1.

Quadro 1 - Espécies da família Lauraceae selecionadas e coletadas em Manaus. As coletas foram realizadas na Reserva Ducke e na mata da Universidade Federal do Amazonas.

| Espécies coletadas | Nome popular | Local |
|--|---------------------|---------------|
| <i>Aniba ferrea</i> Kubitzki | Canelão rosa | Reserva Ducke |
| <i>Aniba panurensis</i> (Meisn,) Mez | Louro-amarelo | Reserva Ducke |
| <i>Aniba parviflora</i> (Meisn,) Mez | Louro-rosa | Reserva Ducke |
| <i>Aniba rosaeodora</i> Ducke | Pau-rosa | Reserva Ducke |
| <i>Licaria cannella</i> subsp, <i>angustata</i> Kurz | Louro-preto | Reserva Ducke |
| <i>Licaria martiniana</i> (Mez) Kosterm | louro-chumbo | Reserva Ducke |
| <i>Mezilaurus duckei</i> van der Werff | Itaúba-abacate/ubá | Reserva Ducke |
| <i>Ocotea ceanothifolia</i> (Nees) Mez | - | Reserva Ducke |
| <i>Ocotea leucoxydon</i> (Sw,) Laness, | louro-do-igapó, | Reserva Ducke |
| <i>Ocotea nigrescens</i> Vicent, | louro-santo | UFAM |
| <i>Paraia bracteata</i> Rohwer et al | - | UFAM |
| <i>Rhodostemonodaphne peneia</i> Madriñán | - | Reserva Ducke |

3.1.2 Obtenção dos extratos

Os extratos foram obtidos a partir das folhas e galhos. Cada um deles submetido à extração por Soxhlet durante 24 horas em etanol e filtrados. Após esta etapa, o solvente foi eliminado em evaporador rotatório, sob pressão reduzida.

Os extratos foram avaliados por Cromatografia em Camada Delgada (CCD), para tal, foram solubilizados em clorofórmio e aplicados, com auxílio de capilar, em cromatofolhas de alumínio (AL TLC Silicagel 60 F254, Merck, 5 x 4 cm). O sistema

foi mantido em câmara de saturação com eluente apropriado e revelado com revelador Draggendorf e vanilina sulfúrica.

3.1.3 Obtenção das frações alcalóidicas

Os extratos foram submetidos ao fracionamento ácido-básico (Figura 15). Foi adicionada ao extrato seco a solução de ácido clorídrico 10%. As substâncias apolares foram extraídas utilizando hexano e as de média e baixa polaridade após a adição de diclorometano. Após a retirada do diclorometano a fração aquosa foi alcalinizada com hidróxido de amônio até pH 9-10 e extraída com o mesmo volume de diclorometano. A fração orgânica resultante foi concentrada em evaporador rotatório sob pressão reduzida.

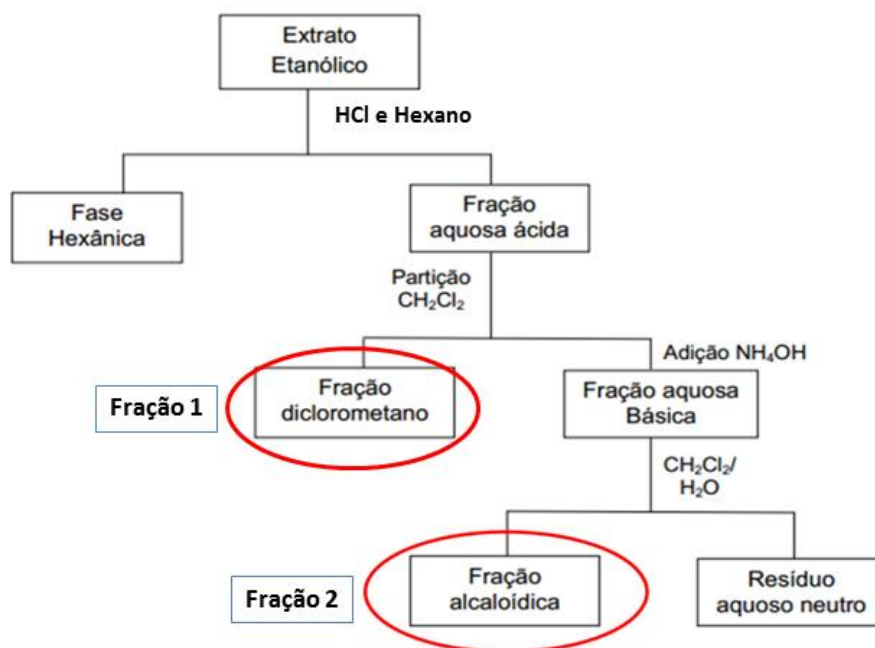


Figura 15 - Fluxograma simplificado da partição ácido-base. Os extratos etanólicos e as frações 1 e 2 foram utilizadas nos ensaios de atividade biológica.

3.1.4 Isolamento

O isolamento dos alcaloides foi realizado em cromatografia em coluna aberta em fase normal empacotada com gel de sílica Silicycle G60 (70-230 mesh). Os eluentes foram previamente determinados por Cromatografia em camada delgada. A cromatografia foi realizada em coluna de vidro com diâmetro interno de 2,0 cm. O isolamento foi de acordo com Souza (2014). O extrato da espécie selecionada foi solubilizado em MeOH/ H₂O (8:2), particionado com hexano e seco. A fração obtida foi fracionada em coluna aberta de fase normal. Utilizou-se como fases móveis Hex/AcOEt/MeOH em gradiente crescente de polaridade. As frações foram coletadas em Erlenmeyer e secas. As frações com o alcaloide de interesse foram identificadas por cromatografia em camada delgada e espectrometria de massas. A identificação dos alcaloides isolados foi realizada em colaboração com outros participantes do grupo Q-Bioma e fazem parte de dissertações de mestrado já defendidas (Souza, 2014) ou ainda em andamento.

3.2 Atividade Biológica *in vitro*

Os ensaios para avaliação das frações alcaloídicas e dos alcaloides purificados contra *Leishmania amazonensis*. e *T. cruzi* foram realizadas no Laboratório de Inovação Tecnológica no Desenvolvimento de Fármacos e Cosméticos da Universidade Estadual de Maringá (UEM), sob coordenação do professor Dr. Celso Vataru Nakamura. Já a atividade frente à *L. mexicana* foi realizada durante o período de doutorado sanduíche na Universidade de York sob orientação do Prof. Jeremy Mottram.

3. 2.1 Cultivo de células

3.2.1.1 *Trypanosoma cruzi*

Os experimentos foram realizados com a cepa Y de *T. cruzi*. Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram mantidas em cultura axênica a 28 °C com repiques semanais em meio LIT B (*liver infusion tryptose*), pH 7.4 suplementando com 10% de soro fetal bovino inativado.

Tripomastigotas e amastigotas foram obtidas do sobrenadante de células LLCMK₂ (células de rim de macaco - *Macaca mulata*) previamente infectadas em de *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) suplementado com 2 mM L-glutamina, 10% SFB, 50 mg/l gentamicina e tamponado com bicarbonato de sódio. Foram mantidos em estufa com 5% CO₂, a 37 °C.

3.2.1.2 *Leishmania amazonensis*.

Promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/Josefa) foram mantidas em meio Warren a 25 °C [*brain-heart infusion* com hemina (10 µg/mL) e ácido fólico (10 µg/mL), pH 7.2] suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (FBS; Gibco Invitrogen, New York, NY, USA).

3.2.1.3 *Leishmania mexicana*

A forma promastigota da cepa de *Leishmania mexicana* (MNYC/BZ/62/M379) foi cultivada em meio Eagle modificado (HOMEM) suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal bovino inativado (SFB) e 1 % (v/v) de solução penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich) em estufa a 25°C.

A forma amastigota axênica da mesma foi obtida a partir de cultura em fase logarítmica tardia de promastigotas. Para tal, 1 x 10⁶ parasitos /ml foram inoculados em meio Schneider modificado (Schneider's *Drosophila* com 2,5mg/ml de Hemina) com 20% de soro fetal bovino, pH 5,5 e mantidos em estufa a 35 °C e 5% de CO₂. Após 120 horas os parasitos são considerados amastigotas axênicas e foram utilizados para os ensaios de viabilidade.

3.2.2 Ensaios viabilidade, proliferação e mecanismo

3.2.2.1 Preparo das soluções estoque das substâncias

Em todos os ensaios, soluções estoque dos extratos, frações e isolados foram preparados assepticamente na concentração de 10.000 µg/mL em dimetilsulfóxido 100% (DMSO; Sigma-Aldrich-Aldrich). Após o preparo, as soluções estoque foram armazenadas a -20 °C. Para os ensaios estas soluções foram posteriormente diluídas em meio de cultura adequado para que a concentração final de DMSO não ultrapassasse 1% nos experimentos, concentração que não afeta a viabilidade dos parasitos (LAZARIN-BIDÓIA et al., 2013; VOLPATO et al., 2013).

3.2.2.2 Viabilidade e proliferação de *T. cruzi*

Tripomastigotas foram ressuspendidas em meio DMEM suplementando com 10% de soro fetal bovino na concentração de 2×10^7 parasitos/mL. A suspensão foi adicionada em placa de 96 poços. Os extratos, frações e isolados foram diluídos em DMSO e DMEM no dobro da concentração desejada: 10, 100, 500 e 1000 µg/mL para extrato e frações; e 1, 5, 10, 50 e 100 µg/mL para isolados e adicionados na placa. A placa foi incubada por 24 h a 37 °C. Considerando a mobilidade do parasito, o que permite distinguir sua viabilidade, foi utilizado o método Pizzi-Brener. Onde uma alíquota de 5 µL de cada amostra foi adicionada em lâminas cobertas por lamínulas e contadas imediatamente em microscópio óptico. A concentração efetiva para 50% dos parasitos (CE_{50}) foi determinada após a contagem.

Formas epimastigotas com 96 h de cultivo foram inoculadas com concentração de 1×10^6 células/mL em meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), em placas de 24 poços estéreis, na presença dos extratos e isolados, diluídos em DMSO a 1%, 10, nas concentrações de 10, 50, 100, 500 e 1000 µg/mL para extrato e frações; e 1, 5, 10, 50 e 100 µg/mL para isolados. Incubadas por 96 h a 28 °C. Após a incubação foi realizada contagem em câmara

de Newbauer das amostras diluídas em formalina. Os resultados foram expressos como a porcentagem de inibição em relação ao controle. As concentrações que inibem a proliferação de 50 e 90% dos protozoários (CI₅₀ e CI₉₀) foram determinadas por análise de regressão logarítmica.

3.2.2.3 Avaliação da atividade em amastigotas intracelulares de *T. cruzi*

Células LLCMK₂ na concentração de $2,5 \times 10^5$ células/mL em meio DMEM suplementado com 10% de SFB foram dispensadas em lamínulas de vidro redondas, dispostas em cada poço da placa de 24 poços por um período de 24 h em estufa com 5% de CO₂ a 37 °C. Após esse período, o meio foi retirado e a placa incubada por mais 24 h na presença de formas tripomastigotas de *T. cruzi* (1×10^7 parasitos/mL) em meio DMEM suplementado com 10% de SFB. Após a interação entre os parasitos e as células, os poços foram lavados e as células tratadas nas concentrações de 10, 50, 100, 500 e 1000 µg/mL para extrato e frações; e 1, 5, 10, 50 e 100 µg/mL para isolados, em seguida, a placa foi incubada em estufa de CO₂ a 37 °C por 96 h. Após esse período as células sobre as lamínulas foram fixadas com metanol por 15 minutos, coradas com solução de Giemsa 5% e montadas sobre lâmina de vidro com PermOUNT. A visualização de pelo menos 200 células foi realizada em microscópio óptico comum e o índice de sobrevivência estabelecido multiplicando-se o percentual de macrófagos infectados pelo número médio de parasitos por macrófagos. A CI₅₀ foi determinada por análise de regressão logarítmica.

3.2.2.4 Avaliação da citotoxicidade em células de mamífero

A citotoxicidade foi avaliada em células LLCMK₂ utilizando o ensaio de viabilidade celular através da redução do MTT (MOSSMANN, 1983). Este método se baseia na capacidade das enzimas desidrogenases mitocondriais em converter o sal de tretazólio (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide) hidrossolúvel em um composto púrpura insolúvel, denominado formazan. Para isso, células na concentração de $2,5 \times 10^5$ células/mL em meio DMEM suplementado

com 10% de SFB, foram cultivadas em placas de 96 poços e mantidas a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 h. Após 24 h os extratos e o isolado foram adicionados em concentrações crescentes: 10, 50, 100, 500 e 1000 µg/mL para extrato e 1, 5, 10, 50 e 100 µg/mL para o isolado. A placa foi em seguida incubada durante 96 h. Após o tratamento as células foram lavadas com PBS e incubadas na presença de MTT (2 mg/mL), após 4 h os cristais de formazan foram solubilizados em DMSO e a leitura da absorbância realizada a 492 nm em um espectrofotômetro de placas (Bio Tek FI-600– Power Wave XS). A percentagem de células viáveis foi calculada em relação ao controle. A concentração citotóxica para 50% (CC₅₀) foi determinada por análise de regressão logarítmica.

3.2.2.5 Atividade antiproliferativa em *Leishmania* spp.

Formas promastigotas de *L. amazonensis* com 48 h de cultivo foram inoculadas com concentração de 1×10^6 células/mL em meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), em placas de 24 poços estéreis na presença dos extratos e do alcaloide indólico, diluídos em DMSO a 1%, em concentrações de 10, 50, 100, 500 e 1000 µg/mL para extrato e 1, 5, 10, 50 e 100 µg/mL para o isolado. Em seguida foram incubadas por 72 h a 25 °C. Para a leitura do experimento o conteúdo do poço foi diluído em formalina a 3%, a contagem realizada em câmara de Neubauer e os resultados expressos como a porcentagem de inibição em relação ao controle. A CI₅₀ foi determinada por análise de regressão logarítmica.

Já para os ensaios com promastigotas e amastigotas de *L. mexicana*, foi utilizada a substância resazurina para avaliar o efeito dos alcaloides isolados. Resazurina sódica (Sigma-Aldrich-Aldrich) foi utilizada. A solução foi preparada com tampão fosfato 1 %, pH 7 e esterilizada por filtração antes de ser utilizada. A solução foi mantida em -20 °C sob abrigo da luz. Formas promastigotas e amastigotas de *L. mexicana* foram inoculadas com concentração de 1×10^6 células/mL em meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), em placas de 96 poços estéreis na presença dos isolados em concentrações de 1 a 100 µg/mL. Após 48 h a 25 °C (promastigotas) ou 35 °C (amastigotas), foi adicionado 20 µl da solução de resazurina 2 mM e as placas incubadas por mais

24 h. Após o período, redução da resazurina foi determinada através da leitura de fluorescência com emissão de 590 nm em leitor de microplaca (BMG Polarstar Optima). O valor do controle (branco) foi subtraído. Cada concentração foi testada em triplicata.

3.2.2.6 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos

A citotoxicidade foi avaliada em macrófagos J774A1 utilizando o ensaio de viabilidade celular através da redução do MTT (MOSMANN, 1983), como descrito para citotoxicidade em células LLCMK₂. Para isso, macrófagos (5×10^5 células/mL) em meio RPMI 1640 suplementado 10% de SFB foram cultivados em placas de 96 poços e mantidos a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 h. Após 24 h, o alcaloide foi adicionado em concentrações crescentes: 1, 5, 10, 50 e 100 µg/mL, e a placa incubada durante 48 h. Após o tratamento as células foram lavadas com PBS e incubadas na presença de MTT (2 mg/mL), após 4 h os cristais de formazan foram solubilizados em DMSO e a leitura da absorbância realizada a 492 nm em um espectrofotômetro de placas (Bio Tek – Power Wave XS). A percentagem de células viáveis foi calculada em relação ao controle. A CC₅₀ foi determinada por análise de regressão logarítmica.

3.2.2.7 Alterações morfológicas por microscopia eletrônica de varredura e transmissão

Para microscopia eletrônica de varredura (MEV), formas promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^6 parasitos/mL) com cultivo de 48 h foram tratadas com as concentrações de 95,7 µM e 187,5 µM, correspondentes ao CI₅₀ e CI₉₀ do alcaloide, ou não tratados (controle) durante 48 h e incubadas a 25 °C. Após esse período as células foram coletadas por centrifugação, lavadas em PBS 0,01 M pH 7,2. Em seguida, as amostras foram fixadas por imersão em glutaraldeído (Electron Microscopy Science; EMS) 2,5% em tampão cacodilato de sódio 0,1 M em temperatura ambiente, durante 3 h e transferidos para tubos 1,5 mL. Após esse período, as células foram lavadas com tampão PBS 0,1 M e aderidas em um suporte (lamínula) com poli-L-lisina (Sigma-Aldrich-Aldrich) por 60 min. As células

aderidas foram lavadas com tampão PBS 0,1 M, desidratadas em concentrações crescentes de etanol (15, 30, 40, 70, 80, 95 e 100%), submetidas ao ponto crítico através da substituição do etanol por dióxido de carbono (CO₂), metalizadas com ouro e visualizadas em microscópio eletrônico de varredura Shimadzu SS-550.

Para microscopia eletrônica de transmissão (MET), os parasitos foram tratados e fixados em glutaraldeído, como descrito para MEV. Após a fixação por no mínimo 3 h, foram lavadas com tampão PBS 0,1 M, pós-fixadas em tetróxido de ósmio 1% e ferrocianeto de potássio 0,8% a temperatura ambiente, lavadas em tampão PBS 0,1 M, desidratadas com acetona em concentrações crescentes (30, 50, 70, 80, 95, 100%), incluídas em resina Embed-812 (Electron Microscopy Sciences; EMS) e polimerizadas em estufa a 60 °C durante 72 h. Cortes ultrafinos foram feitos em ultramicrótomo, em seguida, inseridos em uma grade de cobre, contrastados com acetato de uranila 5% em água destilada, durante 40 min, e citrato de chumbo, durante 40 min. A visualização foi realizada em microscópio eletrônico de transmissão JEOL JEM-1400.

3.2.2.8 Citometria de fluxo

Foi utilizada citometria de fluxo para avaliar a integridade da membrana, potencial da mitocôndria e volume celular. Para tal, formas promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^6 parasitos/mL) com cultivo de 48 h foram tratadas ou não (controle) com as concentrações de 95,7 µM e 187,5 µM, correspondentes ao CI₅₀ e CI₉₀ do isolado, por 24 h. Após incubação as células foram coletadas por centrifugação, lavadas em PBS 0,01 M pH 7,2.

A integridade da membrana celular foi determinada utilizando o corante iodeto de propídio (IP) (Invitrogen®). Após a lavagem, os parasitos foram incubados com solução iodeto de propídeo (IP) em PBS (2 µg/mL) por 5 min. Em seguida, analisadas em citômetro de fluxo BD FACSCalibur equipado com software CellQuest. Digitonina (40 µM) foi usada como controle positivo. O IP é excitável por laser de argônio (480 nm) e emite fluorescência na faixa de 560 – 635.

O potencial de membrana mitocondrial foi determinado utilizando Rodamina 123 (Rh 123) (Sigma-Aldrich®, St Louis, MO, USA). Os parasitos tratados como descrito acima, foram incubados com solução de rodamina 123 (Rh 123) (5 µg/mL

em etanol) por 15 min, lavadas e ressuspendidas em PBS, e incubadas por 30 min. Em seguida, analisadas no mesmo citômetro de fluxo. Cianeto de 3-clorofenilhidrazona (CCCP) (100 μ M) foi usado como controle positivo. A Rh 123 é excitável por laser de argônio (480 nm) e emite fluorescência na faixa de 515-530 nm (MENNA-BARRETO, 2005).

Já o volume celular foi avaliado sem nenhuma marcação após o tratamento. Os parasitos foram avaliados quanto a granulosidade e tamanho pelo mesmo equipamento descrito acima. Actinomicina D (20 mM) foi usada como controle positivo.

3.2.2.9 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) total

A detecção de espécies reativas de oxigênio (EROs) total foi realizada com o marcador H₂DCFDA. Para isso, formas promastigotas de *L. amazonensis* (1 \times 10⁶ parasitos/mL) com cultivo de 48 h foram incubadas a 25 °C com concentrações correspondentes ao CI₅₀ e CI₉₀ do isolado, ou não tratadas (controle) por 24 h. Após o tratamento as células foram lavadas e ressuspendidas em PBS pH 7,2 e incubadas com H₂DCFDA (10 μ g/mL) por 1 h a 25 °C. Após incubação foi adicionado 100 μ L de cada tratamento em cada poço da placa preta de 96 poços e a fluorescência foi medida utilizando um leitor de microplacas de fluorescência (Victor X3; PerkinElmer) a λ_{ex} = 488 nm e λ_{em} = 530 nm.

3.2.2.10 Detecção de vacúolos autofágicos

A detecção de vacúolos autofágicos foi realizada utilizando o marcador monodancilcaverina (MDC) (Sigma-Aldrich-Aldrich®). Para isso, formas promastigotas de *L. amazonensis* (1 \times 10⁶ parasitos/mL) com cultivo de 48 h foram tratadas com CI₅₀ e CI₉₀ do isolado ou não tratadas (controle) por 24 h e incubadas a 25 °C. Após tratamento as células foram lavadas, ressuspendidas em PBS e incubadas com MDC (0,05 μ M) por 1 h a 25 °C. Após incubação as células foram lavadas, ressuspendidas em PBS e visualizadas em microscópio de fluorescência Olympus BX51 (Olympus) e as imagens adquiridas com câmera UC30 (Olympus).

Wortmanina (WTM) (200 nM), um inibidor de autofagia, foi usado como controle (JIMENEZ et al., 2008).

3.2.2.11 Detecção de corpos lipídicos

Formas promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^6 parasitos/mL) foram tratadas ou não (controle) com CI_{50} e CI_{90} do isolado por 24 h e incubadas a 25 °C. Após o tratamento foram centrifugadas, lavadas em duas vezes em PBS e incubadas com 10 µg/ml vermelho do nilo (Sigma-Aldrich-Aldrich, St. Louis, MO, USA) por 30 min em temperatura ambiente. Após a marcação, os parasitos foram analisados em um leitor de microplacas de fluorescência (Victor X3; PerkinElmer) a $\lambda_{ex} = 485$ nm e $\lambda_{em} = 535$ nm.

2.2.3 Análise estatística

As percentagens de 50% e 90% de inibição (CI_{50} e CI_{90}) foram determinadas por curvas de concentração linear e os resultados expressos pela média e desvio padrão de pelo menos 3 experimentos independentes. Já os dados dos experimentos de quantificação de corpos lipídicos e espécies reativas de oxigênio foram analisados usando análise de variância (ANOVA), e a diferença entre os grupos foram comparadas pelo teste de Tukey. Valores de $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significantes. Todas as análises foram realizadas em GraphPad Software.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Extratos etanólicos: obtenção e atividade *in vitro*

As espécies de *Lauraceae* utilizadas neste trabalho foram selecionadas de acordo com resultados anteriores do grupo de pesquisa em Química de Biomoléculas da Amazônia (Q-Bioma). Estudos prévios identificaram os principais constituintes dos extratos e mostraram a atividade biológica de óleos essenciais e extratos etanólicos de diversas espécies de *Lauraceae*. Os resultados indicam que os extratos de espécies do gênero *Aniba*, *Ocotea* e *Licaria* são ricos em alcaloides e tem alta atividade antioxidante, anticolinesterásica, bactericida e antitumoral (ALCÂNTARA, 2009; SOUZA, 2014; YAMAGUCHI, 2011).

Das espécies definidas e coletadas para esta tese, somente *Paraia bracteata* e *Rhodostemonodaphne peneia* ainda não haviam sido avaliadas quimicamente pelo grupo e, até o momento, não foram encontrados dados na literatura sobre a composição química e atividade biológica destas.

Os extratos etanólicos foram preparados utilizando extrator Soxhlet. Essa metodologia apresentou alto rendimento tanto de folhas quanto galhos, como pode ser observado na Tabela 1. Os extratos obtidos a partir das folhas de todas as espécies tiveram maior rendimento em comparação aos obtidos dos galhos. Os maiores rendimentos foram de folhas de *A. panurensis* e *P. bracteata*: 10,1 e 11%, respectivamente.

Tabela 1- Porcentagem de rendimento dos extratos etanólicos de Lauraceae. Os extratos etanólicos foram obtidos por extração em Soxhlet.

| Espécies | Parte da Planta | Rendimento extrato (%) |
|-----------------------------|------------------------|-------------------------------|
| <i>A. ferrea</i> | Folhas | 8,1 |
| <i>A. ferrea</i> | Galhos | 6,3 |
| <i>A. panurensis</i> | Folhas | 10,1 |
| <i>A. panurensis</i> | Galhos | 6,0 |
| <i>L. canella angustata</i> | Folhas | 9,2 |
| <i>L. canella angustata</i> | Galhos | 5,5 |
| <i>L. martiniana</i> | Folhas | 9,5 |
| <i>L. martiniana</i> | Galhos | 8,0 |
| <i>M. duckei</i> | Folhas | 9,5 |
| <i>M. duckei</i> | Galhos | 9,3 |
| <i>O. ceanothifolia</i> | Folhas | 3,5 |
| <i>O. ceanothifolia</i> | Galhos | 3,0 |
| <i>O. leucoxylon</i> | Galhos | 4,3 |
| <i>O. nigrescens</i> | Galhos | 5,0 |
| <i>O. nigrescens</i> | Folhas | 5,2 |
| <i>P. bracteata</i> | Folhas | 11,0 |
| <i>P. bracteata</i> | Galhos | 9,0 |
| <i>R. peneia</i> | Galhos | 2,5 |

Após a obtenção dos extratos, foi iniciado o ensaio bioguiado a fim de selecionar as espécies com maior potencial antitripanosoma. Primeiramente, foi utilizado o protozoário parasito *T. cruzi*, agente etiológico da doença de Chagas. O ensaio bioguiado foi iniciado com testes em tripomastigotas, a forma não multiplicativa e infectiva de *T. cruzi*, a fim de estabelecer as espécies com potencial atividade frente à forma evolutiva encontrada no hospedeiro vertebrado (STUART et al., 2008). Como parâmetro para selecionar os extratos, foram utilizados os resultados em tripomastigotas. Os extratos capazes de ocasionar a morte de 50% dos parasitos (CE₅₀) em concentrações inferiores a 50 µg/mL foram selecionados para os demais testes. O desenho esquemático do ensaio bioguiado está ilustrado na figura 16 e os resultados obtidos na varredura inicial na tabela 2.

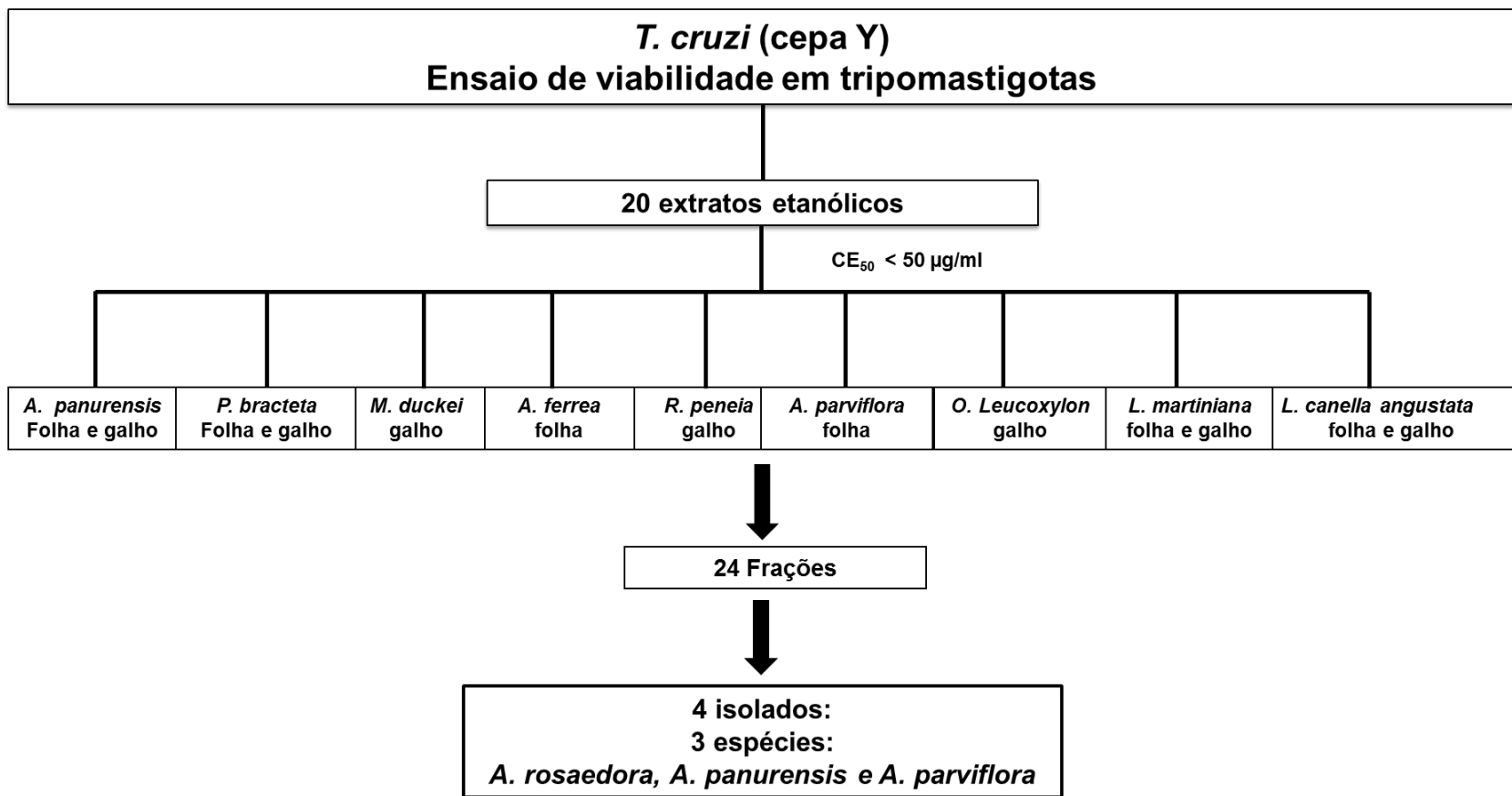


Figura 16 - Fluxograma do ensaio bioquímico utilizando tripomastigotas de *T. cruzi* como modelo. A partir dos resultados com os extratos mais ativos, foram selecionadas as frações a serem utilizadas. Ao final do ensaio bioquímico, obteve-se 4 alcalóides isolados. A atividade destes será descrita posteriormente.

Tabela 2- Atividade dos extratos etanólicos de folhas e galhos em formas tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi*. Os resultados estão em concentração responsável pela inibição do crescimento ou viabilidade dos parasitos em 50%. Os valores de CC₅₀ são referentes à atividade em linhagem celular LLCMK₂. NR: não realizado. DP: desvio padrão. IS_{Tr}: índice de seletividade tripomastigotas. IS_{Epi}: índice de seletividade epimastigotas.

| Espécies | Parte da planta | Tripomastigota CE ₅₀ µg/mL ±DP | Epimastigota CI ₅₀ µg/mL ±DP | LLCMK ₂ CC ₅₀ µg/mL ±DP | IS _{Tr} | IS _{Epi} |
|-----------------------------|-----------------|--|--|--|------------------|-------------------|
| <i>A. ferrea</i> | Folhas | 15,5±4,5 | 312,5±17,6 | 82,5±3,5 | 5,3 | 0,3 |
| <i>A. ferrea</i> | Galhos | 149,0±1,4 | NR | NR | | |
| <i>A. panurensis</i> | Folhas | 11,3±1,9 | NR | 85,0±7 | 7,5 | |
| <i>A. panurensis</i> | Galhos | 21,1±1,5 | 19,6±1,7 | 55,0±7 | 2,6 | 2,9 |
| <i>A. parviflora</i> | Folhas | 7,2±0,3 | 39,6±4,7 | 150,5±43,1 | 20,8 | 3,8 |
| <i>A. rosaeodora</i> | Galhos | 201,6±2,3 | NR | NR | | |
| <i>L. canella angustata</i> | Folhas | 15,2±0,3 | 67,2±7,4 | 158,0±11,3 | 10,4 | 2,4 |
| <i>L. canella angustata</i> | Galhos | 11,2±1,7 | 221,6±40 | 183,3±23,6 | 16,4 | 0,8 |
| <i>L. martiniana</i> | Folhas | 45,0±21,2 | NR | 56,6±4,7 | 1,3 | |
| <i>L. martiniana</i> | Galhos | 5,7±0,3 | 255,0±7 | 85,0±21,2 | 14,8 | 0,3 |
| <i>M. duckei</i> | Folhas | 210,0±14,1 | NR | NR | | |
| <i>M. duckei</i> | Galhos | 9,1±1,2 | 253,8±5,4 | 114±7 | 12,5 | 0,4 |
| <i>O. ceanothifolia</i> | Folhas | 16,6±1,2 | 62,8±4,8 | 89,5±53 | 5,4 | 1,4 |
| <i>O. leucoxydon</i> | Galhos | 11,0±1,4 | 190 | 138 | 12,5 | 0,7 |
| <i>O. nigrescens</i> | Folhas | 202,4±3,4 | NR | NR | | |
| <i>O. nigrescens</i> | Galhos | 216,0±12,7 | NR | NR | | |
| <i>O. ceanothifolia</i> | Galhos | 221,4±20,1 | NR | NR | | |
| <i>P. bracteata</i> | Folhas | 10,9±1,2 | 45,0±7 | 150,0±56,5 | 13,8 | 3,3 |
| <i>P. bracteata</i> | Galhos | 5,7±0,7 | 21,8±3 | 106,0±29,7 | 18,6 | 4,9 |
| <i>R. peneia</i> | Galhos | 5,5±0,7 | 270,0±14,1 | 116,6±4,7 | 21,2 | 0,4 |

Extratos etanólicos de 9 espécies utilizadas apresentaram EC₅₀ abaixo de 50 µg/mL e foram considerados ativos frente a tripomastigotas: *A. ferrea* folhas (15,5 µg/mL), *A. panurensis* folhas (11,3 µg/mL) e galhos (21,1 µg/mL), *L. canella angustata* folhas (15,2 µg/mL) e galhos (11,2 µg/mL), *L. martiniana* folhas (45 µg/mL) e galhos (5,7 µg/mL), *M. duckei* galhos (9,1 µg/mL), *O. ceanothifolia* folhas (16,6 µg/mL), *O. leucoxydon* galhos (111 µg/mL), *P. bracteata* folhas (10,9 µg/mL) e galhos (5,7 µg/mL) e *R. peneia* galhos (5,5 µg/mL).

Após os ensaios contra tripomastigotas, os extratos das 9 espécies selecionadas foram testados frente à forma epimastigota, forma multiplicativa encontrada no inseto vetor. A atividade inibitória de crescimento de 50% dos parasitos (CI₅₀) após 96 h de tratamento foi menor em comparação aos resultados em formas tripomastigotas. Em trabalho anterior do grupo QBioma, ensaios com *A. panurensis*, *L. canella angustata*, *M. duckei* e *O. nigrescens* demonstraram que a atividade destes extratos está acima 50 µg/mL quando testados em epimastigota (Alcântara, 2009), corroborando os resultados aqui obtidos. Os testes mostram que as formas tripomastigotas foram mais susceptíveis ao tratamento com os extratos. Alguns autores sugerem que a diferença de sensibilidade aos tratamentos pode ser devido a fatores morfológicos, bioquímicos e genéticos de cada forma, visto que o ambiente se altera drasticamente do hospedeiro humano para o invertebrado (GONÇALVES *et al.*, 2011; IZUMI *et al.*, 2011; PELIZZARO-ROCHA *et al.*, 2010; SOUZA, W., 2009).

Adicionalmente, células LLCMK₂ foram tratadas com os extratos a fim de verificar a citotoxicidade em células de mamífero após 96 h de exposição ao extrato. A citotoxicidade em células de mamífero foi comparada com a atividade antiprotozoário utilizando o índice de seletividade: LLCMK₂CC₅₀/tripomastigotaCE₅₀ ou LLCMK₂ CC₅₀/epimastigota CI₅₀. Os extratos tiveram índice de seletividade acima de 1 contra a forma clínica relevante tripomastigotas, indicando maior toxicidade para os parasitos quando comparados com células de mamífero. Por outro lado, o índice de seletividade em epimastigota foi mais baixo.

Vários trabalhos utilizando extratos e óleos essenciais de diferentes famílias de plantas demonstraram atividade antiprotozoário (FOURNET *et al.*, 1993; BERGER *et al.*, 2001; TEMPONE *et al.*, 2005; SCHINOR *et al.*, 2007; MENNA-BARRETO *et al.*, 2008; ALVIANO *et al.*, 2012; SCHMIDT *et al.*, 2012; RODRIGUES

et al., 2014a). Em varredura utilizando diversas famílias da flora brasileira, como *Annonaceae*, *Apiaceae*, *Cucurbitaceae*, *Lamiaceae*, *Lauraceae*, *Moraceae*, *Nyctaginaceae* e *Verbenaceae* demonstrou que o extrato etanólico dos frutos de *Ocotea paranapiacabensis* (*Lauraceae*) e *Aegiphila lhotzkiana* (*Lamiaceae*) são ativos frente formas epimastigotas de *T. cruzi* (ALVES et al., 2012). Duas neolignanais isoladas de *Nectandra lineata* e dois alcaloides isolados de *N. megapotamica* também inibiram o crescimento do protozoário (SANTOS-FILHO; SARTIS 1980).

Analisando o efeito exercido pelos extratos etanólicos, observa-se que os extratos etanólicos dos galhos de *R. peneia* e *P. bracteata* foram os que apresentaram maior atividade contra tripomastigotas com CE_{50} de 5,7 e 5,5 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Devido a esse resultado, os extratos foram analisados quanto à atividade em amastigota intracelular e *in vivo*, utilizando modelo murino. Os resultados dos ensaios com os dois extratos estão em Apêndice B, visto que foram experimentos realizados fora dos objetivos do ensaio bioguiado e estão em análise e preparação para o artigo.

Dando continuidade aos ensaios de atividade *in vitro* dos extratos, estes foram avaliados frente à *L. amazonensis*. A forma promastigota foi tratada com os extratos etanólicos por 72 h a fim de verificar a atividade antiproliferativa de 13 espécies de *Lauraceae*. A concentração dos compostos responsável por inibir 50% do crescimento dos parasitos (CI_{50}) está representada na tabela 3.

Tabela 3- Atividade dos extratos etanólicos em promastigota de *L. amazonensis*. Os valores representam a concentração do extrato responsável pela inibição de 50% da proliferação do parasito. DP: desvio padrão.

| <i>L. amazonensis</i> promastigotas | | |
|-------------------------------------|-----------------|---------------------------|
| Espécies | Parte da planta | IC ₅₀ µg/mL±DP |
| <i>A. ferrea</i> | Folhas | >1000 |
| <i>A. ferrea</i> | Galhos | 655±77,7 |
| <i>A. panurensis</i> | Galhos | 13,2±1,2 |
| <i>A. parviflora</i> | Folhas | 15,2 ±1,4 |
| <i>A. rosaeodora</i> | Galhos | 14,6±0,9 |
| <i>L. canella angustata</i> | Folhas | 207,5±3,5 |
| <i>L. canella angustata</i> | Galhos | 162,5±60,1 |
| <i>L. martiniana</i> | Folhas | 16,5±4,9 |
| <i>L. martiniana</i> | Galhos | 300,0±14,1 |
| <i>M. duckei</i> | Folhas | 221,0±19,7 |
| <i>M. duckei</i> | Galhos | 237,5±17,6 |
| <i>O. ceanothifolia</i> | Folhas | 34,5±9,1 |
| <i>O. ceanothifolia</i> | Galhos | 61,6±2,3 |
| <i>O. leucoxydon</i> | Galhos | 126,6±9,4 |
| <i>O. nigrescens</i> | Folhas | 101,0±19,7 |
| <i>O. nigrescens</i> | Galhos | 322,5±24,7 |
| <i>P. bracteata</i> | Folhas | 14,2±1,0 |
| <i>P. bracteata</i> | Galhos | 16,0±0,3 |
| <i>R. peneia</i> | Galhos | 320,0±7,0 |

Os extratos de folhas de *A. parviflora* e *L. martiniana*, *O. ceanothifolia*, *P. bracteata* e os de galhos de *A. panurensis*, *A. rosaeodora* e *P. bracteata* foram os mais ativos, com IC₅₀ abaixo de 50 µg/mL. Em trabalho anterior do nosso grupo, a concentração do extrato etanólico de *A. rosaeodora* que inibiu 50% de *L. amazonensis* foi de 180 µg/mL (Alcântara, 2009), bem acima do resultado obtido neste trabalho (14,6 µg/mL). Essa diferença pode ser devido a época da coleta do material vegetal, visto que a concentração de metabólitos é variável devido a fatores biológicos e/ou ambientais, como sazonalidade, índices pluviométricos, fisiologia, desenvolvimento da planta, entre outros (GOUVEA et al., 2012).

Foi demonstrado que várias substâncias provenientes de espécies de *Lauraceae* possuem atividade anti-*Leishmania*. Extratos de *O. lancifolia* e *A. canelilla* tem atividade *in vitro* frente à *Leishmania* e *T. cruzi* (FOURNET; BARRIOS; MUÑOZ, 1994; FOURNET et al., 2007; SILVA et al., 2009). Lignanas de *N. megapotamica* e *O. duckei* também apresentaram atividade contra o protozoário (MONTE NETO et al., 2007; ADEMAR et al., 2008). SÁNCHEZ-SUÁREZ e

colaboradores (2011) demonstraram que substâncias, principalmente lignanas, extraídas de *O. macrophylla* e *P. cinereum* possuem atividade frente à *L. panamensis* e *L. braziliensis*, embora os extratos brutos destas espécies não tenham demonstrado atividade contra estes protozoários. Sugerindo a presença de substâncias antagônicas nos extratos, o que diminuiria a atividade destes (SANCHEZ-SUAREZ; RIVEROS; DELGADO, 2013).

4.2 Frações alcaloídicas: obtenção e atividade *in vitro*

Dando continuidade ao ensaio bioguiado, os extratos mais ativos frente às tripomastigotas foram submetidos à partição ácido-base para fracionamento dos extratos. Como esquematizado em MATERIAL E MÉTODOS (item 2.1.3), as duas frações foram utilizadas no ensaio *in vitro*. No entanto, visto que o foco da tese é no isolamento de alcaloides, foi calculado o rendimento da fração alcaloídica obtida após a partição (Tabela 4). De acordo com os resultados apresentados na tabela 5 os rendimentos (%) das frações alcaloídicas (Fração 2) realizado a partir de 1 g de extrato etanólico variaram de 0,2 a 2,4%.

Tabela 4 - Porcentagem de rendimento das frações alcalóidicas. As frações alcalóidicas foram obtidas por partição ácido-base.

| Espécies | Parte da planta | Rendimento fração 2 (%) |
|-----------------------------|------------------------|--------------------------------|
| <i>A. ferrea</i> | Folhas | 0,6 |
| <i>A. panurensis</i> | Folhas | 0,2 |
| <i>A. panurensis</i> | Galhos | 0,3 |
| <i>L. canella angustata</i> | Folhas | 0,2 |
| <i>L. canella angustata</i> | Galhos | 0,4 |
| <i>L. martiniana</i> | Folhas | 1,3 |
| <i>L. martiniana</i> | Galhos | 2,2 |
| <i>M. duckei</i> | Galhos | 1,9 |
| <i>O. leucoxylon</i> | Galhos | 2,4 |
| <i>P. bracteata</i> | Folhas | 0,5 |
| <i>P. bracteata</i> | Galhos | 0,8 |
| <i>R. peneia</i> | Galhos | 0,6 |

Como definido pelo ensaio com os extratos, as frações alcalóidicas obtidas da partição ácido-base de extratos mais ativos foram testadas em formas tripomastigotas de *T. cruzi*. Com intuito de comparar a atividade das frações, a primeira fração obtida da partição também foi avaliada. Esta fração pode conter substâncias neutras e alcaloides de baixa basicidade (CUNHA; BARBOSA FILHO, 2014). No total foram avaliadas 24 frações de 9 espécies (Tabela 5). A atividade dos extratos está demonstrada na tabela novamente a fim facilitar a comparação com a atividade das frações.

Tabela 5- Atividade das frações obtidas por partição ácido-base em forma tripomastigota de *T. cruzi*. Na tabela estão os valores do CE₅₀ dos extratos e suas respectivas frações obtidas após a partição. DP: desvio padrão.

| <i>T. cruzi</i> tripomastigotas | | | | |
|---------------------------------|-----------------|-------------------------------|-------------------------------|-------------------------------|
| Espécies | Parte da planta | Extrato | Fração 1 | Fração 2 |
| | | CE ₅₀ µg/mL ±DP | CE ₅₀ µg/mL ±DP | CE ₅₀ µg/mL ±DP |
| <i>A. ferrea</i> | Folhas | 15,5±4,5 | 135,0±21 | 109,0±12,7 |
| <i>A. panurensis</i> | Folhas | 11,3±1,9 | 71,6±2,8 | 97,3±23,6 |
| <i>A. panurensis</i> | Galhos | 21,1±1,5 | 5,5±0,1 | 63,3±14,1 |
| <i>L. canella angustata</i> | Folhas | 15,2±0,3 | 15±4,2 | 1,2±0,1 |
| <i>L. canella angustata</i> | Galhos | 11,2±1,7 | 1,5±0,7 | 2,1±1,5 |
| <i>L. martiniana</i> | Folhas | 45±21,2 | 3,3±1 | 14,1±1,1 |
| <i>L. martiniana</i> | Galhos | 5,7±0,3 | 55,0±7 | 1,1±0,2 |
| <i>M. duckei</i> | Galhos | 9,1±1,2 | 62,1±11,1 | 176,3±14,5 |
| <i>O. leucoxydon</i> | Galhos | 11,0±1,4 | 70,0±14 | 65,0±7 |
| <i>P. bracteata</i> | Folhas | 10,9±1,2 | 58,1±1,2 | 135,7±15,1 |
| <i>P. bracteata</i> | Galhos | 5,7±0,7 | 50,2±4,3 | 95,0±7 |
| <i>R. peneia</i> | Galhos | 5,5±0,7 | 176,7±7,5 | 223,5±1,73 |

As frações foram, em sua maioria, menos ativas que os extratos. Somente as frações de galhos de *A. panurensis*, folhas e galhos de *L. canella angustata* e *L. martina* foram mais ativas que os extratos. Esse resultado pode ser devido a combinação de várias substâncias dos extratos, que ao serem fracionadas tem a atividade diminuída. De fato, por serem misturas complexas de metabólitos secundários, os extratos podem ser mais ativos quando comparados às frações.

As frações de *L. canella angustata* e *L. martiniana* foram mais ativas que os extratos. Pode-se notar que em algumas espécies, a fração alcaloídicas foi menos ativa. Foi descrito que espécies do gênero *Licaria* apresenta o alcaloide reticulina. Esse alcaloide foi avaliado quanto à sua atividade neurofarmacológica, demonstrando efeito no sistema nervoso central de camundongos (MORAIS; ALMEIDA, 1998; CUSTÓTIDO; DA VEIGA-JUNIOR, 2014). Além disso, é interessante ressaltar, que a reticulina tem sido produzido a partir da expressão heteróloga em *Escherichia coli* (KIM et al., 2014). Este fato torna interessante a avaliação de outras atividades biológicas de reticulina, como a atividade em *T. cruzi*, visto que após a elucidação do mecanismo de ação pode ser possível produção em larga escala da substância eliminando o problema de baixo

rendimento na produção de substâncias derivadas de produtos naturais. Outros alcaloides e demais moléculas também estão sendo produzidos por expressão heteróloga, o que instiga a busca por novas moléculas da classe, bem como possíveis usos na indústria farmacêutica (KUTCHAN, 1996; ROBINSON; PANACCIONE, 2014).

4.3 Alcaloides isolados: obtenção e atividade *in vitro*

A partir dos resultados do ensaio bioguiado, escolheu-se as espécies do gênero *Aniba*, *Licaria* e *Ocotea* para isolamento de alcaloides. Com as técnicas de cromatografia em coluna e MPLC (cromatografia em coluna de média pressão, foi possível o isolamento de 4 alcaloides das espécies: *Aniba roseadora*, *Aniba panurensis* e *Aniba parviflora*. Duas das substâncias isoladas de *A. panurensis* e *A. parviflora* ainda não tiveram a elucidação estrutural e só foram avaliadas frente à *L. mexicana*, não sendo ativas. Assim, elas não serão apresentadas na presente tese. Os dois alcaloides analisados e identificados foram o alcaloide piridínico anibina ($C_{11}H_9NO_3$) e o alcaloide indólico 3-metoxi-2-oxa-4,10b-diaza-1,3,6a,10c-tetrahidrofluoranthano-3,5-diol ($C_{14}H_{12}N_2O_4$).

O isolamento da anibina foi realizado de acordo com Custódio (2013) a partir da fração alcaloídica de *A. roseadora* utilizando coluna cromatográfica. A confirmação foi feita por espectrometria de massas (Figura 17), a qual observou-se o íon protonado 204, característico do alcaloide anibina (MORS; GOTTLIEB; JERASSI, 1957).

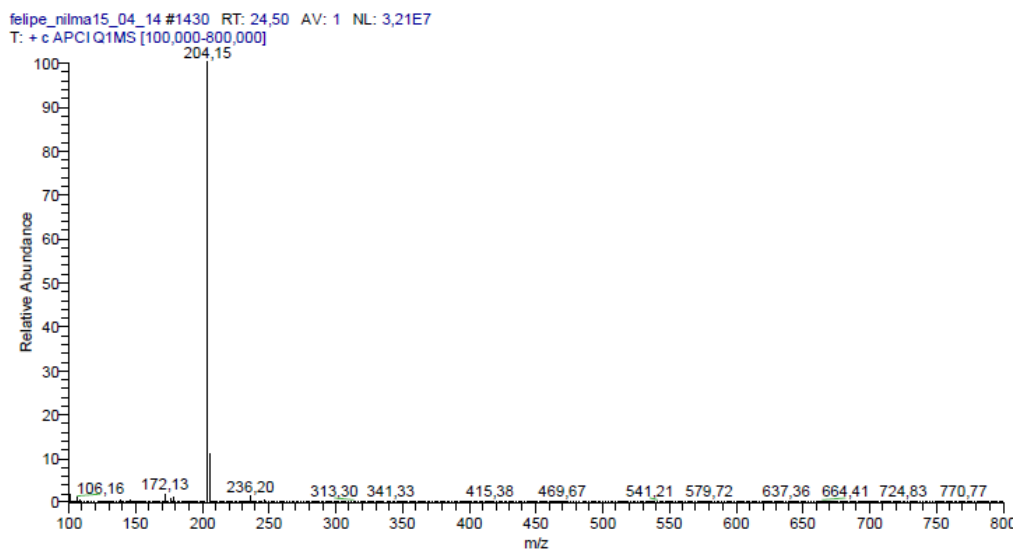


Figura 17 - Espectro de massas total para confirmação do isolamento de anibina. Observa-se o íon molecular protonado 204, o qual caracteriza o alcaloide (MORS; GOTTLIEB; DJERASSI, 1957).

O alcaloide indólico 3-metoxi-2-oxa-4,10b-diaza-1,3,6a,10c-tetrahidrofluoranthano-3,5-diol foi isolado e caracterizado pela primeira vez pelo nosso grupo (Souza, 2014). Neste trabalho foi realizada espectrometria de massas total em modo positivo para confirmação da substância isolada anteriormente (Figura 18). Na figura observa-se o íon protonado 273, sugerindo que o alcaloide seja de número par de nitrogênio. A estrutura foi identificada por Souza (2014) após análise da fragmentação do espectro e de dados de RMN de ^1H e bidimensionais (HMBC e HSQC).

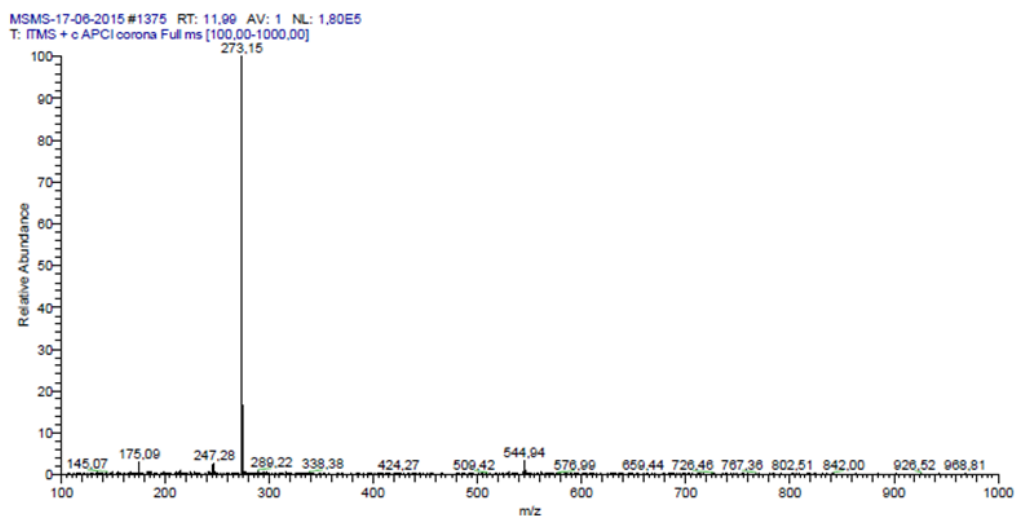


Figura 18- Espectro de massas para confirmação do isolamento de 3-metoxi-2-oxa-4,10b-diaza-1,3,6a,10c-tetrahidrofluoranthano-3,5-diol. Observa-se o íon molecular protonado 273, o qual caracteriza o alcaloide com Souza, 2014.

As estruturas do alcaloide piridínico anibina ($C_{11}H_9NO_3$) e do alcaloide indólico 3-metoxi-2-oxa-4,10b-diaza-1,3,6a,10c-tetrahidrofluoranthano-3,5-diol ($C_{14}H_{12}N_2O_4$) podem ser vistas na figura 19.

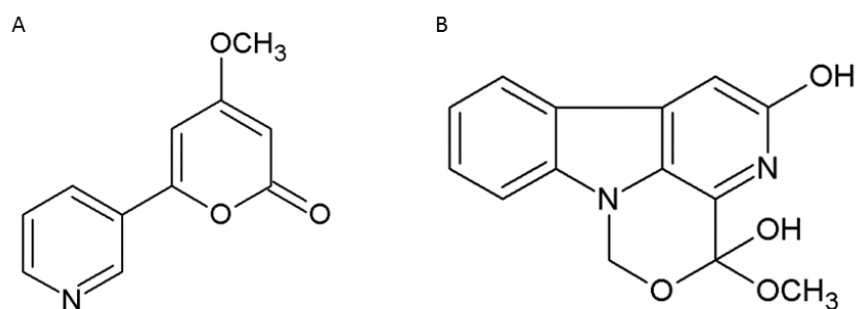


Figura 19 - Estrutura dos alcaloides isolados. (A) Anibina; (B) 3-metoxi-2-oxa-4,10b-diaza-1,3,6a,10c-tetrahidrofluoranthano-3,5-diol (1).

Quanto à atividade biológica, a anibina foi avaliada quanto ao seu efeito viabilidade de tripomastigotas de *T. cruzi* e amastigotas axênicas e promastigotas de *L. mexicana*. Não foi observada alteração na viabilidade *T. cruzi* em nenhuma concentração testada (1 a 1000 µM) após 24 h de tratamento. Em *L. mexicana*, o alcaloide também não foi ativo após 72 h de tratamento em ambas as formas. Não existem dados suficientes na literatura sobre a atividade deste alcaloide. O único trabalho referente à atividade de anibina, até o momento, diz sobre atividade analéptica desse alcaloide (GONCALVES; CORREA; GOTTLIEB, 1958).

Os alcaloides indólicos tem uma estrutura bicíclica, com anel benzeno fusionado ao anel pirrólico. Este anel contendo átomo de nitrogênio dá ao alcaloide a propriedade de basicidade, fazendo com que sejam ativos farmacologicamente. Esta classe está amplamente distribuída em famílias como *Apocynaceae*, *Loganiaceae*, *Rubiaceae*, e *Nyssaceae* (EL-SAYED; VERPOORTE, 2007; SAGI et al., 2016). Até o momento, nosso grupo foi o primeiro a relatar o isolamento de alcaloides dessa classe em *A. panurensis*. Em revisão recente, foram citados alguns importantes alcaloides indólicos já isolados de plantas, como a reserpina, anti-hipertensivo e os anti-tumorais, vimblastina e vincristina (HAMID; RAMLI; YUSOFF, 2017).

Além das diversas atividades relatadas dos alcaloides indólicos, foi ainda mostrado *in silico* que substâncias dessa classe podem se ligar a tripanotriose reductase, enzima exclusiva de tripanosomatídeos (OGUNGBE; SETZER, 2016). Visto isso, foi avaliado o efeito deste alcaloide indólico, a partir daqui chamado de **(1)**, frente às três formas de *T. cruzi* e contra formas promastigotas de *L. amazonensis*. Os resultados estão apresentados na tabela 6.

Tabela 6– Atividade de (1) em *T. cruzi* e *L. amazonensis*. ^a Concentração efetiva responsável por reduzir em 50% a viabilidade de tripomastigotas de *T. cruzi*; ^b Concentração responsável pela inibição de 50% da proliferação das formas epimastigota e amastigota de *T. cruzi* e promastigota de *L. amazonensis*. Os resultados estão representados também em µg/mL para comparação com a atividade dos extratos. DP: desvio padrão; IS: Índice de seletividade; * índice de seletividade calculado utilizando células LLCMK₂; ** índice de seletividade calculado utilizando macrófagos J774A1.

| Alcaloide (1) | | | |
|------------------------------|--------------|------------------------|-----------|
| | µg/mL | µM ± DP | IS |
| <i>T. cruzi</i> | | | |
| Tripomastigota | 12,6 | 47,46±7,2 ^a | 5,6* |
| Epimastigota | 11,3 | 41,6±5,6 ^b | 6,5* |
| Amastigota | 19,0 | 69,8±5,1 ^b | 4,6* |
| <i>L. amazonensis</i> | | | |
| Promastigota | 26,0 | 95,7±0,2 ^b | 1,6** |
| <i>L. mexicana</i> | | | |
| Promastigota | | >100 | - |
| Amastigota axênica | | >100 | - |

Quando (1) foi testada em tripomastigotas após 24 h de tratamento, observou-se uma inibição da viabilidade dose-dependente com CE₅₀ de 47,46 µM. Os testes em epimastigotas após tratamento por 96 h mostraram atividade inibitória semelhante com CI₅₀ 41,6 µM. Quanto às formas amastigotas, após incubação por 96 h na presença da droga, tanto o número de células infectadas quanto a quantidade de amastigotas por células foi reduzido em relação ao controle. A inibição de 50% do crescimento de amastigotas foi alcançada na concentração de 69,8 µM. Os resultados expressos em µg/mL são para comparação com a atividade dos extratos. Observa-se que a atividade do isolado é semelhante à do extrato etanólico dos galhos de *A. panurensis*, indicando assim, que este alcaloide pode ser o responsável pela atividade (Tabela 6). Ainda que o alcaloide utilizado tenha atividade em concentrações moderadas, o índice de seletividade foi considerado

intermediário para as três formas. Para obter tal valor, células LLCMK₂ foram incubadas com diferentes concentrações de **(1)** e após 96 h foi determinada a concentração citotóxica (CC₅₀) para as células de mamífero. Através da comparação do CC₅₀ com a concentração da droga que inibe o 50% do crescimento dos parasitos (CI₅₀ ou CE₅₀) obteve-se o índice de seletividade (IS). Nesse caso, os IS acima de um para as três formas de *T. cruzi* (IS_{tripo}: 5,6; IS_{epi}: 6,5; IS_{sama}: 4,6) indicam que **(1)** é mais tóxico para o protozoário que para células de mamíferos *in vitro*. A cepa Y de *T. cruzi* é parcialmente resistente ao benznidazol, sendo um bom modelo para busca de novos fármacos com mecanismo de ação diferente. No entanto, o alcaloide foi menos ativo em formas tripomastigotas: EC₅₀13μM para o benznidazol (GUEDES-DA-SILVA et al., 2016) e EC₅₀ 47μM, para **(1)**.

O efeito em promastigotas de *L. amazonensis* após tratamento por 72 h com **(1)** é dose dependente com CI₅₀ de 95,7 μM (26,0 μg/mL) (Tabela 7). Para cálculo do índice de seletividade foi utilizado o efeito citotóxico de **(1)** em macrófagos J774G8. Após 48 h de tratamento o CC₅₀ obtido foi 1,6 vezes maior que o CI₅₀, indicando que o alcaloide é mais tóxico para os parasitos que para os macrófagos humanos. Já em *L. mexicana*, não foi observado nenhum efeito em concentrações de até 100 μM, indicando que as diferenças entre as espécies podem alterar na atividade da substância.

Segundo revisão de IZUMI e colaboradores (2011), 29% das substâncias utilizadas para testes em *T. cruzi* eram alcaloides. O alcaloide esteroideal sarachina foi avaliado contra epimastigotas de *T. cruzi*, com CI₅₀ de 25 μM após 48 h de incubação. Com a mesma concentração, o alcaloide inibiu 100% do crescimento de promastigota de *L. amazonensis* (MORETTI et al., 1998). Alcaloides isoquinolínicos isolados da família *Ancistrocladaceae* inibiram a concentração e a proliferação de amastigotas de *T. cruzi* e *L. donovani*. A comparação da estrutura dos alcaloides isolados dessa família e as atividades obtidas nos testes sugere que a ligação de grupo metil ao nitrogênio reduz drasticamente a atividade dos alcaloides frente aos protozoários (BRINGMANN et al., 2000, 2002, 2003). Outros alcaloides indólicos, como os β-carbolínicos foram estudados e apresentam atividade anti-*Leishmania* e antitripanosoma (VALDEZ et al., 2012; VOLPATO et al., 2013a; STEFANELLO et al., 2014). Sugere-se que o anel carbolínico da molécula possa intercalar na molécula DNA ou induzir apoptose através da permeabilização

da membrana mitocondrial em células humanas (HANS et al., 2005; ZHAO et al., 2006). Em estudo recente, foi demonstrado que o N-butil-[1-(4-metóxi)fenil-9H-carbolina]-3-carboxamida bloqueia a citocinese em *L. amazonensis* (STEFANELLO et al., 2014). Adicionalmente, os alcaloides da família *Lauraceae*, nordomesticina e caaverina, isolados de *O. lancifolia* causaram a lise de aproximadamente 70% das tripomastigotas de *T. cruzi* (FOURNET et al., 2007; ZANIN; LORDELLO, 2007; IZUMI et al., 2011).

Como descrito, vários alcaloides demonstram atividade contra os tripanosomatídeos, no entanto, em nenhum deles o mecanismo de ação é completamente elucidado. A identificação de novas moléculas e o exato mecanismo de ação, possibilita melhor uso das substancia, já que estas podem ser modificadas a fim de melhorar a efetividade. Um exemplo, é o de WRIGHT e colaboradores (2001) que reportaram que o alcaloide indoquinolínico criptolepina tem uma potente atividade antiplasmódio, no entanto, tem capacidade de se intercalar ao DNA humano, sendo altamente tóxico. Os autores verificaram que a atividade frente ao plasmódio não é dependente da capacidade de interação do alcaloide com o DNA. Dessa forma, foram sintetizadas moléculas com diferentes estruturas a fim de aumentar a eficiência da criptolepina (WRIGHT et al., 2001). Esse trabalho exemplifica tanto a necessidade de entender a estrutura da molécula quanto definir o exato mecanismo de ação desta no alvo. Sendo possível a obtenção de drogas mais efetivas para o tratamento de doenças.

4.4 Efeito do alcaloide indólico de *A. panurensis* em *Leishmania amazonensis*

Após verificar que o composto **(1)** inibe a proliferação de *L. amazonensis*, foram feitos ensaios para identificar o mecanismo de ação deste alcaloide nas formas promastigotas. A concentração do alcaloide isolado que inibe 50% da proliferação das formas promastigotas, é alto, considerado o padrão de inibição das substâncias em teste ou em uso, sendo alguns trabalhos demonstrando atividades em escala de nanomolar (DE MACEDO-SILVA et al., 2013; COGO et al., 2015; KAPLUM et al., 2016). No entanto, outros trabalhos que visam determinar o mecanismo de ação de substâncias, inclusive, miltefosina, utilizam concentrações

altas para induzir efeitos deletérios em *Leishmania* (CORRAL et al., 2016). Como por exemplo, Marinho e colaboradores (2011), que utilizaram concentração de 40 μM de miltefosina em *L. amazonensis* e identificaram características de morte celular semelhantes a apoptose (MARINHO et al., 2011). Ainda, durante a execução dos experimentos, foi observado que concentrações menores de **(1)** induzem alterações morfológicas na população de promastigotas (Figura 20). Na figura abaixo, os parasitos tratados com 10 μM do alcaloide (Figura 20 B) exibem alterações morfológicas, incluindo aumento celular e aumento do número de flagelos. Visto que mesmo concentração menor que a responsável pelo CI_{50} induz alterações em promastigotas, outros ensaios foram feitos a fim de buscar o mecanismo no qual o alcaloide inibe a proliferação de *L. amazonensis*.

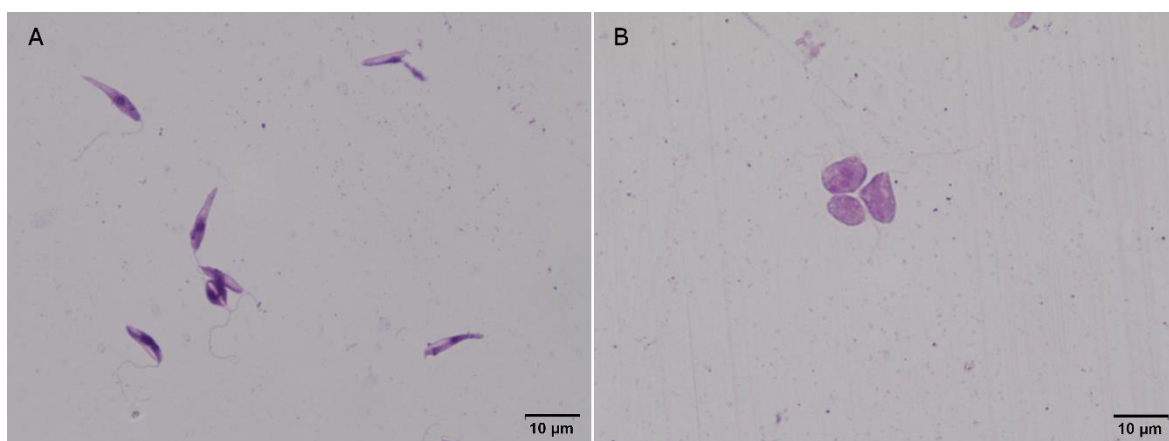


Figura 20- Alterações morfológicas em promastigota de *L. amazonensis* após tratamento com 10 μM de (1) por 72 horas. Em (A) parasito controle, sem tratamento com a substância, observa-se o formato alongado característico da forma promastigota. Em (B), parasitos tratados por 72 com 10 μM de (1). Observa-se formato arredondado e mais de um flagelo por célula. Aumento: 400x

4.4.1 O alcaloide indólico 3-metoxi-2-oxa-4,10b-diaza-1,3,6a,10c-tetrahidrofluoranthano-3,5-diol induz alterações morfológicas em *L. amazonensis*

A fim de verificar as alterações ultra estruturais em formas promastigotas após o tratamento com o alcaloide, foram utilizadas concentrações relativas ao CI_{50} e CI_{90} após 72 h de tratamento. Para tal, os parasitos foram tratados com o CI_{50} (95,7 μ M) e CI_{90} (187,5 μ M) de **(1)** por 72 h e avaliados quanto às alterações estruturais e ultraestruturais utilizando microscopia eletrônica de varredura (MEV) e transmissão (MET) (Figura 21). Observa-se nos parasitos não tratados (Figura 21 A, 21 a) forma típica de promastigotas. Em MEV (Figura 23 A), nota-se o corpo do protozoário alongado e um flagelo anterior, ambos sem alterações. Na imagem de MET (21 a) pode-se visualizar o núcleo, cinetoplasto e flagelo únicos sem alterações. Após o tratamento, células com tamanho anormal, multiflageladas (Figura 21B, 21b, 21C, 21c) e multinucleadas (Fig. 21b, 21c) foram observadas. Em MEV, observa-se formato heterogêneo dos parasitos, corpo celular com volume alterado e número de flagelos variados em comparação ao controle. Todas as promastigotas observadas apresentam mais de 3 flagelos após o tratamento. A exposição a maiores concentrações de **(1)**, como é o caso do CI_{90} , causa diminuição do volume celular e alteração a superfície de *L. amazonensis*.

A alteração do volume celular foi avaliada por citometria de fluxo (Figura 22). Os parasitos tratados com o CI_{50} têm maior volume quando comparados com o controle e o CI_{90} . Este fato pode ser devido à multiplicação das organelas no CI_{50} , tornando o parasito maior. No tratamento com CI_{90} , os parasitos estão menores, provavelmente devido ao colapso celular ocasionado pelo bloqueio da citocinese e possível degradação das organelas.

Apesar dessas alterações estruturais externas, cortes ultrafinos de MET demonstram que a estrutura básica característica de tripanosomatídeos, como a posição do núcleo e estruturas flagelares permaneceram. Além disso, aparentemente não houve despolimerização dos microtúbulos subpelículas (Fig. 21b, 21c; cabeça de seta). Os flagelos também apresentam o padrão clássico 9+2. (Fig. 21b, 21c). No tratamento com CI_{90} observa-se ainda estruturas membranares envolvendo o núcleo, sugerindo um processo autofágico (Fig. 21c).

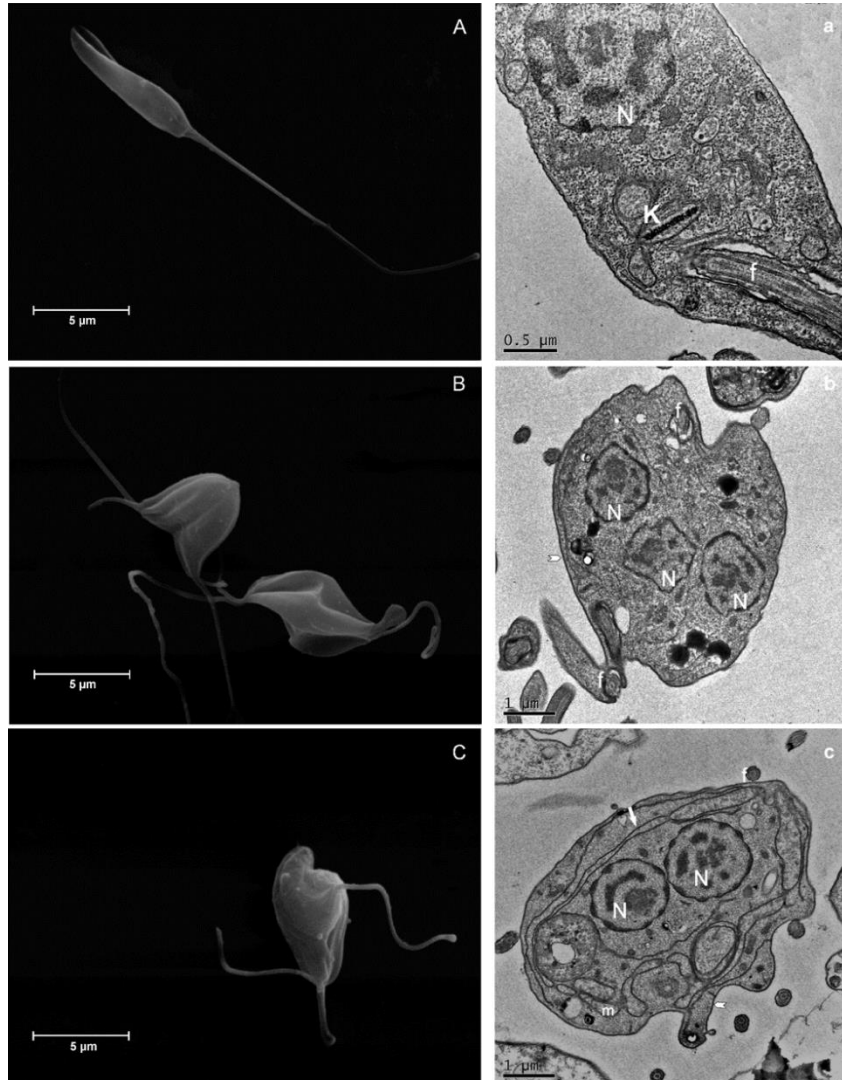


Figura 21 - Alterações morfológicas em formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com (1) por 72 h. Alterações visualizadas por microscopia eletrônica de varredura (A-C) e de transmissão (a-c). (A, a) controle (parasitos não tratados); (B, b) CI₅₀ (C, c) CI₉₀. N: núcleo; f: flagelo; K: cinetoplasto; m: mitocôndria; Seta: vacúolos autofágicos; cabeça de seta: microtúbulos subpelicular.

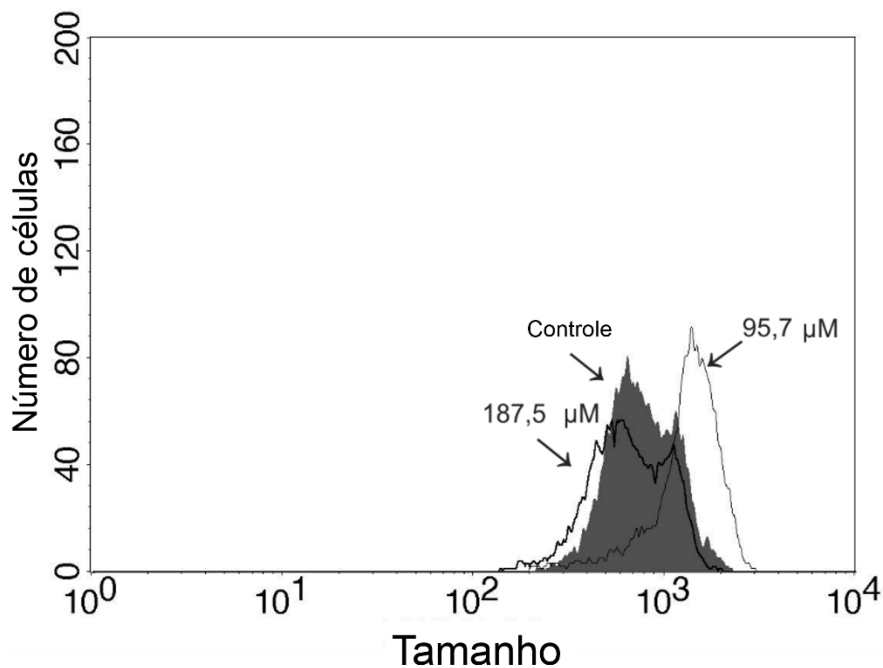


Figura 22- Citometria de fluxo do volume celular em formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com o composto (1) por 24 h. Os parasitos foram tratados com CI_{50} (95,7 μ M) e CI_{90} (187,5 μ M). O canal FSC-H foi considerado em função do tamanho celular e plotado em relação a contagem de células. Foram realizados três experimentos independentes e selecionado imagem para representação gráfica.

Durante o ciclo celular de *Leishmania* as organelas se multiplicam uma única vez. O cinetoplasto e o DNA duplicam na fase S, assim como o início da duplicação do flagelo. Em *L. amazonensis*, a segregação do cinetoplasto pode ocorrer antes ou após a segregação do DNA nuclear, seguida pela citocinese. Esta se inicia na região anterior, entre os dois flagelos (WHEELER; GLUENZ; GULL, 2011; DA SILVA et al., 2013a). Nos resultados aqui apresentados, nota-se que a substância **(1)** não impede a duplicação do flagelo, núcleo e cinetoplasto, ou seja, a duplicação e segregação das organelas não foram afetadas. No entanto, a citocinese foi bloqueada resultando em parasitos com fenótipos anormais.

Alterações estruturais semelhantes com bloqueio da citocinese sem inibição da duplicação de organelas foram observadas por alguns autores quando epimastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *L. amazonensis* foram tratados com os alcaloides da vinca (GRELLIER et al., 1999; BORGES et al., 2005). GRELLIER et al. (1999) sugerem que o bloqueio da citocinese se deve a modulação da interação entre microtúbulos subpeliculares e proteínas associadas aos

microtúbulos pelos alcaloides testados. Demonstraram também que é um efeito reversível, visto que a eliminação da droga reverteu o efeito inibitório e os epimastigotas restauram a capacidade de divisão celular (GRELLIER et al., 1999). Como é possível observar na figura 21b e 21c, tanto a estrutura do flagelo quanto dos microtúbulos subpeliculares estão normais, indicando que o composto **(1)** não impede o crescimento flagelar, nem altera a organização estrutural do citoesqueleto de *L. amazonensis*. Dessa forma, pode-se sugerir que a atividade de **(1)** não está relacionada ao mecanismo de ação antimicrotúbulos, ou que esta substância tem ação somente em microtúbulos relacionados com a citocinese. Além disso, embora a citocinese seja um processo mediado por microtúbulos, a dinâmica de actina está relacionada com a separação do corpo celular e divisão da bolsa flagelar (TAMMANA et al., 2010; DA SILVA et al., 2013a). Dessa forma, a actina e as proteínas relacionadas podem ser o alvo da substância **(1)**.

O tratamento de *L. amazonensis* e *L. donovani* com outros alcaloides β -carbolínicos e outras substâncias como inibidores da síntese de ergosterol e agentes antimicrotúbulos ocasionam as mesmas alterações no ciclo celular. (HAVENS et al., 2000; RODRIGUES; URBINA; DE SOUZA, 2005; PEDROSO et al., 2011; STEFANELLO et al., 2014).

4.4.2 O alcaloide 3-metoxi-2-oxa-4,10b-diaza-1,3,6a,10c-tetrahidrofluoranthano-3,5-diol induz autofagia em *L. amazonensis*

Após observar vacúolos na microscopia eletrônica de transmissão após o tratamento de *L. amazonensis* com **(1)**, utilizamos a marcação com MDC (monodancil-cadaverina), a fim de avaliar se estes vacúolos poderiam ser vacúolos autofágicos. Nos resultados obtidos observa-se fluorescência após o tratamento dos parasitos com **(1)**, indicando a formação de vacúolos autofágicos (Fig. 23b, 23c). A fluorescência não foi observada no controle (Fig. 23a) e foi parcialmente prevenida quando as promastigotas foram pré tratadas com wortmanina (Figura 23 d-f).

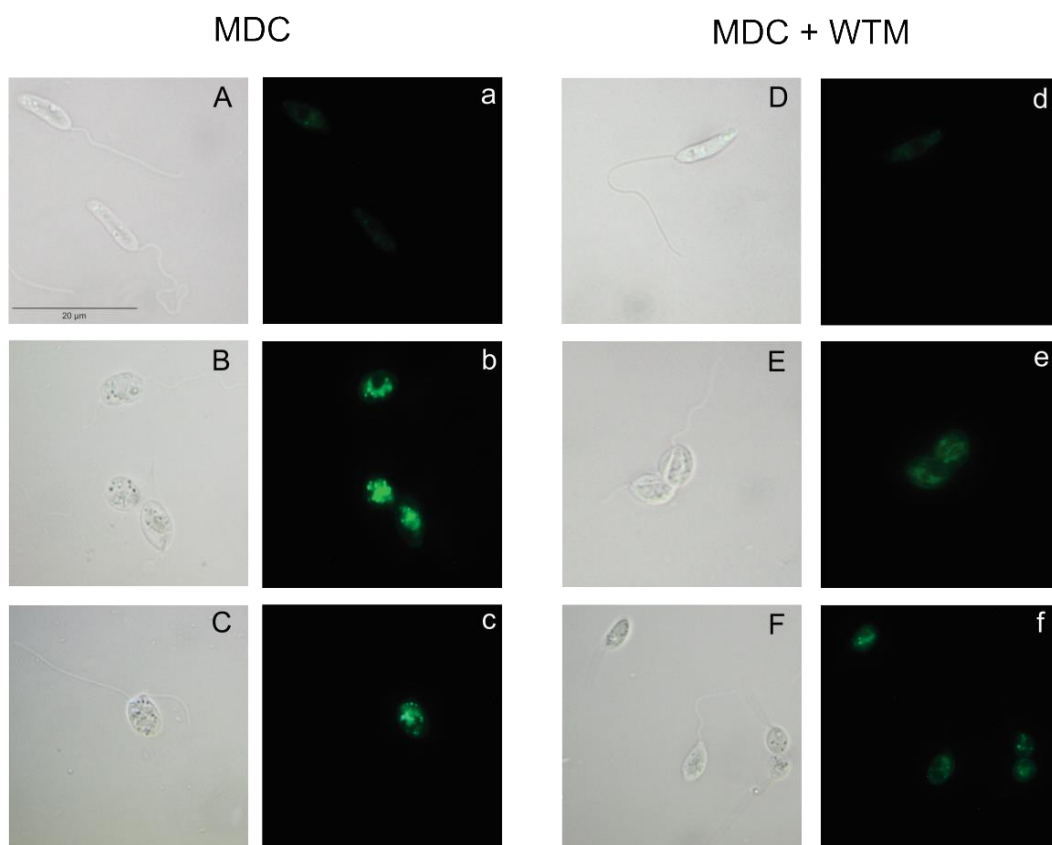


Figura 23- Formação de vacúolos autofágicos em formas promastigota de *L. amazonensis* tratadas com (1). (A-F) Microscopia de contraste de interferência diferencial (DIC); (a-f) microscopia de fluorescência. (B, b) tratados com Cl₅₀; (C,c) tratado com Cl₉₀; (E,e, F,f) promastigotas tratadas com (1) + wortimanina.(WTM)

A autofagia é um mecanismo de degradação de organelas desnecessárias e/ou sem função nas células, através de vacúolos. Em *Leishmania* um importante aspecto dos processos autofágicos é seu papel no remodelamento celular entre o ciclo de vida do parasito (CULL et al., 2015). É considerado um mecanismo de sobrevivência celular, visto que o bloqueio de genes essencialmente autofágicos (ATG, por exemplo) aceleram o processo de morte celular (KROEMER et al., 2009; GALLUZZI et al., 2014). Essa capacidade de proteção por meio de autofagia foi demonstrada em *L. donovani*, tratada com criptolepina. A inibição do processo autofágico acarretou em aumento da atividade da substância frente ao parasito (SENGUPTA et al., 2011). A formação de vacúolos autofágicos em *L. amazonensis* observada no presente trabalho pode ser um processo de defesa ao tratamento com (1), bem como um processo de degradação das organelas em excesso devido impedimento da continuação do ciclo celular.

4.4.3 Alterações metabólicas após o tratamento: Formação de corpos lipídicos, Espécies Reativas de Oxigênio (EROs) e alteração no potencial mitocondrial

A formação de corpos lipídicos foi analisada de forma quantitativa (fluorímetro) e qualitativa (microscópio de fluorescência) (Figura 24). Após o tratamento com concentrações referentes ao CI_{50} e CI_{90} observa-se aumento significativo de corpos lipídicos após leitura em fluorímetro (Figura 24A). A microscopia de fluorescência também demonstra aumento do acúmulo de corpos lipídicos nos parasitos tratados, sendo a marcação mais intensa no tratamento com CI_{90} (Figura 24 C,D), corroborando os resultados quantitativos obtidos.

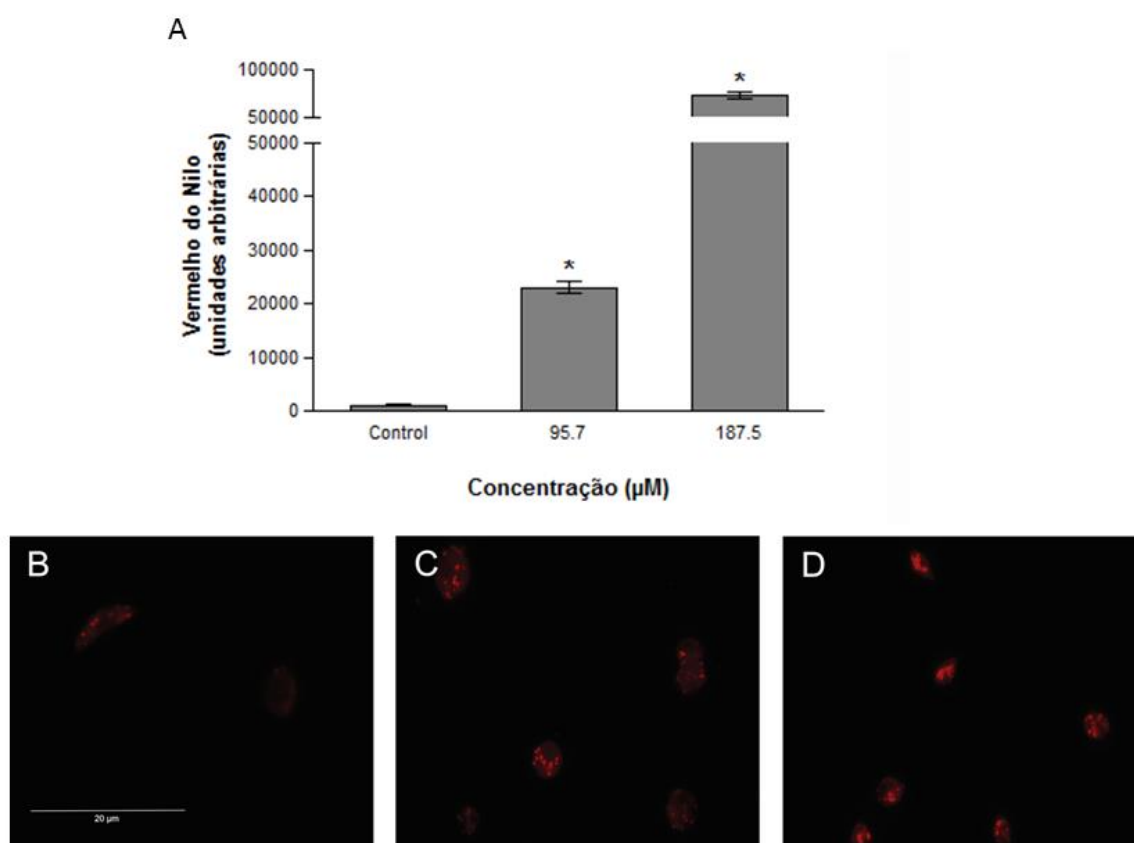


Figura 24- Acúmulo de corpos lipídicos em *L. amazonensis* tratados com a substância (1). (A) Avaliação da fluorescência em promastigotas tratados com CI_{50} e CI_{90} de (1) e marcados com vermelho do Nilo. (B – D) Microscopia de fluorescência de promastigotas não tratados (B) ou tratados com CI_{50} – 95,7 µM (C) e CI_{90} - 187,5 µM. (D). * valores significativos com $p < 0,05$.

A biogênese dos corpos lipídicos é um evento central em inúmeros eventos de homeostasia celular em diferentes eucariotos (DE MACEDO-SILVA et al., 2013; GUEDES-DA-SILVA et al., 2016). São organelas dinâmicas compostas por triglicérides envoltos por monocamada de fosfolípido, associadas ao metabolismo, sinalização e inflamação. Sendo assim, são indicativos de equilíbrio celular (BOREN; BRINDLE, 2012; GUEDES-DA-SILVA et al., 2016).

Visto o papel na homeostasia celular, o acúmulo de corpos lipídicos observado nos parasitos tratados pode ser devido as perturbações celulares e perda da homeostasia. Foi relatado o acúmulo dessas estruturas no citoplasma de *L. amazonensis* tratadas com inibidores de esqualeno sintase, enzima da via de síntese de ergosterol, atribuindo esse acúmulo de lipídeos ao conteúdo de esterol na membrana do parasito (RODRIGUES, *et al.*, 2008). Foi demonstrado ainda que drogas como taxol e alcaloides β -carbolínicos induzem o acúmulo de lipídeos em *L. amazonensis* e *T. cruzi*, sugerindo que alterações não relacionadas à síntese de lipídeos também induzem a formação de corpos lipídicos (DANTAS; BARBOSA; DE CASTRO, 2003; STEFANELLO et al., 2014).

Visto que a acumulação lipídica também está relacionada ao aumento de espécies reativas de oxigênio (EROS) e a disfunção mitocondrial (BOREN; BRINDLE, 2012; LIU et al., 2015), foram avaliadas a produção de EROS e a alteração no potencial de membrana mitocondrial das formas promastigotas tratadas. Para avaliar a produção de EROS nas células foi utilizado o marcador H₂DCFDA. Após clivagem de grupos acetatos por estereases intracelulares e oxidação, o marcador não fluorescente é convertido em uma molécula fluorescente 2',7'-diclorofluoresceína (DCF). Os resultados demonstraram que o tratamento com Cl₅₀ e Cl₉₀ aumentam a fluorescência emitida, com a produção de EROS significativamente superior ao controle (Figura 25). O aumento da formação de EROs é concentração-dependente, visto que na concentração maior, (IC₉₀), houve maior produção.

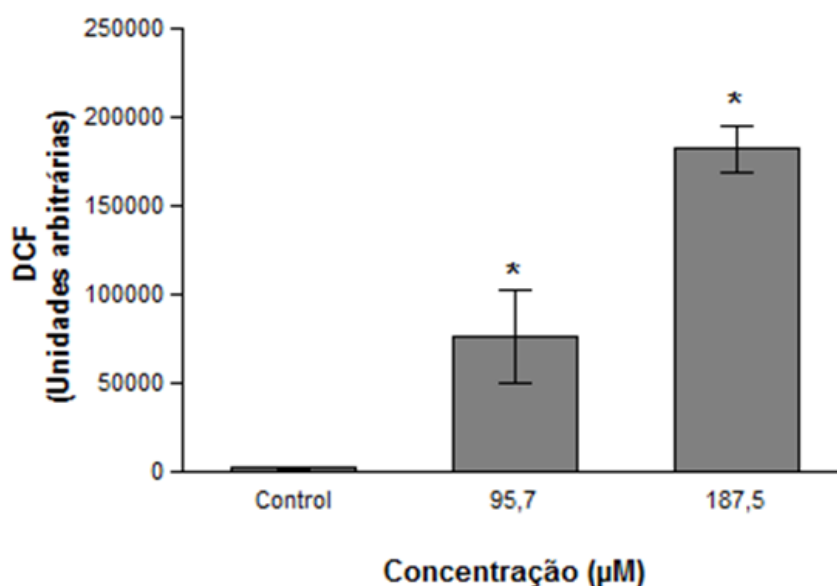


Figura 25- Formação de espécies reativas de oxigênio (EROS) em promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com (1). Os protozoários foram tratados com IC₅₀ – 95,7 µM (C) e IC₉₀ – 187,5 µM por 24 h e foram analisadas em leitor de microplaca. * valores significativos com $p < 0,05$.

A produção de EROs em *Leishmania* já foi demonstrada (SANTHAMMA; BHADURI, 1995). Concentrações baixas de EROs geradas durante o metabolismo celular estão envolvidas em diversos processos de sinalização celular. No entanto, o aumento dessa produção pode acarretar em modificações de macromoléculas, como DNA, proteínas e lipídeos, eventualmente ocasionando a morte celular (GIOVANNINI et al., 2002). O aumento na produção de EROs em *L. amazonensis* após tratamento com quercetina e apigenina foi reportado e induz severos danos aos parasitos (FONSECA-SILVA et al., 2011, 2015). Nos resultados aqui obtidos, pode-se notar que o alcaloide (1) aumenta a produção de EROs em *L. amazonensis*. O tratamento da mesma espécie com alcaloides β-carbolínicos também aumentou a produção de EROS, principalmente O₂^{•-} (VOLPATO et al., 2013a; STEFANELLO et al., 2014).

A fim de verificar a relação da alteração na produção de EROs com a disfunção mitocondrial, foi avaliada alteração do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) em promastigotas após o tratamento com (1). As formas promastigotas foram incubadas com o marcador fluorescente Rh 123, que indica a permeabilidade de prótons na membrana da mitocôndria. A marcação foi analisada

por citometria de fluxo. O tratamento por 24 h com CI_{50} de **(1)** induziu uma hiperpolarização mitocondrial enquanto o tratamento com CI_{90} de **(1)** ocasionou despolarização em uma pequena porcentagem dos parasitos (Figura 26).

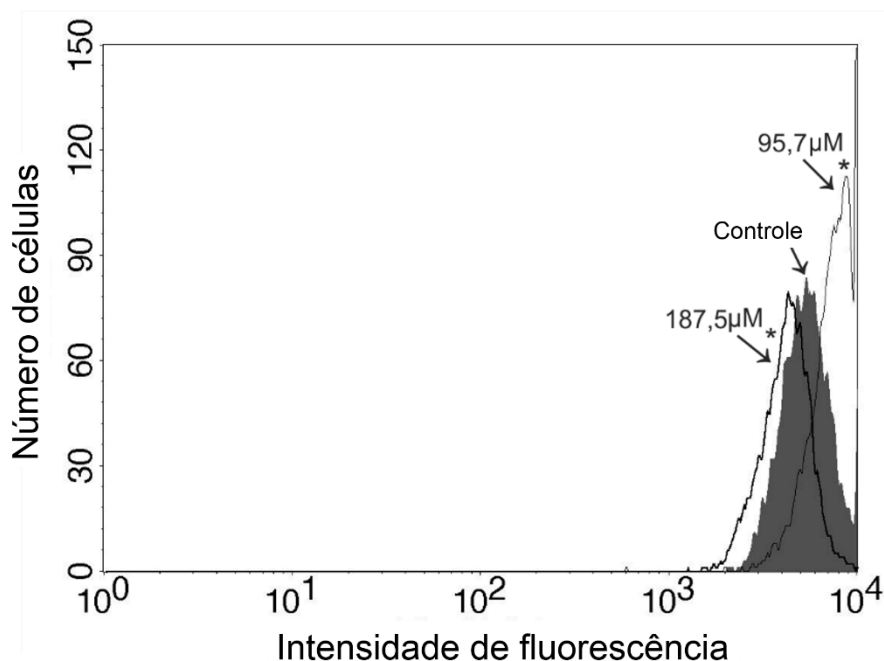


Figura 26- Citometria de fluxo de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com **(1) por 24 h e marcadas com Rh 123.** Promastigotas tratadas com CI_{50} (95,7 μ M) e CI_{90} (187,5 μ M) e parasitos não tratados (controle) estão representados no histograma.

O aumento da respiração mitocondrial e hiperpolarização estão associadas com o aumento da produção de EROs (ALZATE et al., 2007). O tratamento com a substância **(1)** acarretou em hiperpolarização mitocondrial. Em vários casos, essa hiperpolarização acontece antes da despolarização, sendo este fato considerado uma das últimas tentativas das células evitarem a morte (JIMÉNEZ-RUIZ et al., 2010). Esse fato pode explicar a hiperpolarização em doses menores de **(1)** e despolarização mitocondrial no tratamento com o CI_{90} . A maior concentração exacerbou os efeitos tóxicos do alcaloide, impedindo a defesa do parasito contra os danos celulares provocados pelo tratamento.

Vários estudos relatam que o tratamento com substâncias isoladas, incluindo alcaloides, induz alterações no potencial de membrana mitocondrial e aumento na produção de EROs em tripanosomatídeos (LAZARIN-BIDÓIA et al., 2013; VOLPATO et al., 2013a; BRITTA et al., 2014; STEFANELLO et al., 2014; KAPLUM

et al., 2016). A mitocôndria dos protozoários é considerada uma organela com alto potencial para alvo quimioterápico devido a sua estrutura e função única, diferentes da mitocôndria das células hospedeiras. Os aspectos únicos da cadeia transportadora de elétrons e enzimas relacionadas ao metabolismo celular tornam essa organela um alvo promissor (SEN; MAJUMDER, 2008; MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014). Dessa forma, uma nova substância que atue nessa organela, como a utilizada no presente trabalho, pode ser um novo agente quimioterápico para leishmanioses. Além disso, o mecanismo antioxidante do parasito tem menor eficiência que o do ser humano, assim, substâncias que atuem por indução de oxidação poderiam ter efeito no parasito sem afetar o hospedeiro.

Parte do mecanismo de ação de várias substâncias antiprotozoários envolvem aumento na produção de EROs e colapso mitocondrial, levando a morte celular semelhante a apoptose ou necrose. No caso da substância **(1)** avaliada neste trabalho, observa-se que parte do seu mecanismo de ação envolve o metabolismo respiratório, no entanto, também foi observada formação de vacúolos autofágicos, acúmulo de corpos lipídicos e bloqueio na citocinese. Pode-se sugerir que o mecanismo de ação inicial seja no bloqueio da divisão celular e proliferação. E, posteriormente, na tentativa de manter a homeostase o parasito inicia processo autofágico e, conseqüentemente, ocorre colapso celular e morte.

5. CONCLUSÕES - CAPÍTULO I

O ensaio bioguiado utilizando os extratos etanólicos de *Lauraceae* levou ao isolamento de alcaloides, sendo o alcaloide indólico 3-metoxi-2-oxa-4,10b-diaza-1,3,6a,10c-tetrahidrofluoranthano-3,5-diol utilizado pela primeira vez em atividades antiprotozoário. Em resumo, os resultados demonstram a necessidade de explorar a flora Amazônica e que essa biodiversidade ainda é uma fonte de novas moléculas. Ademais, pode-se utilizar ensaios bioguiados e avaliação fenotípica para definir extratos com maior potencial de atividade biológica.

O alcaloide indólico demonstra potencial frente a *L. amazonensis*, induzindo bloqueio na divisão celular e consequente morte do protozoário. O alcaloide ainda pode ser utilizado como modelo para síntese de derivados mais ativos frente à tripanosomatídeos, bem como ser avaliado em demais modelos de parasitos ou doenças, como câncer.

CAPÍTULO II

Geração do modelo de superexpressão como ferramenta na busca de novos fármacos frente à *L. mexicana*

Os resultados apresentados neste capítulo focam no modelo de superexpressão induzida para expressão de proteína quinase em *L. mexicana*. Assim como na geração de um sistema funcional em todos os estágios evolutivos do parasito. O trabalho demonstrado aqui foi realizado durante o período de doutorado sanduíche na Universidade de York, sob orientação do Prof. Jeremy Mottram.

Geração do modelo de superexpressão como ferramenta na busca de novos fármacos frente à *L. mexicana*

Os resultados apresentados neste capítulo focam no modelo de superexpressão induzida para expressão de proteína quinase em *L. mexicana*. Assim como na geração de um sistema funcional em todos os estágios evolutivos do parasito. O trabalho demonstrado aqui foi realizado durante o período de doutorado sanduíche na Universidade de York, sob orientação do Prof. Jeremy Mottram.

1. OBJETIVO DO CAPÍTULO

1.1 Objetivo geral

Induzir a expressão constitutiva de proteínas quinases endógenas em *L. mexicana* e verificar as alterações em promastigotas e amastigotas axênicas.

1.2 Objetivos específicos

- Selecionar proteína quinases envolvidas no ciclo celular e virulência de *L. mexicana*;
- Superexpressar os genes das proteínas selecionadas;

- Aperfeiçoar o sistema de superexpressão induzida a fim de permitir o uso em todas as formas do ciclo de vida de *L. mexicana*;

2. REFERENCIAL TEÓRICO

No referencial teórico do capítulo anterior foi descrito a biologia geral e a epidemiologia da doença de Chagas e leishmaniose. Neste capítulo, o parasito modelo utilizado foi *Leishmania mexicana*, portanto, o referencial teórico versará sobre o ciclo celular, biologia molecular, manipulação genética e superexpressão gênica em tripanosomatídeos.

2.1 Ciclo de divisão celular

O ciclo celular se refere a sequência de eventos que levam a duplicação das células. Durante esse processo, a célula deve replicar seu DNA (fase S) e distribuir as cópias para os núcleos das células filhas durante a mitose (fase M), antes da separação destas. Ao longo do ciclo as organelas também devem ser duplicadas e o tamanho das células mãe e filha mantidos. Todo o processo de duplicação é realizado e controlado durante duas fases (G1 e G2) entre as fases S e M (MORGAN, 2007; HYDBRING; MALUMBRES; SICINSKI, 2016).

A progressão do ciclo celular através das fases (G1, S, G2 e M) é complexa e altamente regulada com vários pontos de *feedback* que impedem a progressão do ciclo em caso de irregularidades (GRANT, 2008). É consenso entre os pesquisadores que muitos dos componentes funcionais e estruturais envolvidos na progressão e regulação do ciclo celular são altamente conservados entre os eucariotos (DE LICHTENBERG et al., 2007; HARASHIMA; DISSMEYER; SCHNITTGER, 2013). No entanto, os eventos transcricionais e pós traducionais tem baixa conservação entre diferentes grupos taxonômicos, o que acarreta em diferenças no processo de divisão (DE LICHTENBERG et al., 2007).

A progressão do ciclo celular é regulada pela produção e degradação de proteínas, como as ciclinas (STANDART et al., 1987), que são sintetizadas em cada fase do ciclo e estão associadas com a ativação de outras proteínas, as proteínas quinases dependente de ciclina, CDKs (*Cyclin-dependent kinases*). CDKs são proteínas que contém um domínio catalítico de quinase e são monômeros inativos. A ativação dessas quinases requer não somente ciclinas, mas também a fosforilação do resíduo de treonina por uma outra proteína quinase,

proteína ativadora de CDK (NURSE, 1990; PINES; HUNTER, 1991; PINES, 1996; BROWN et al., 1999; DORÉE; HUNT, 2002). As CDKs e as ciclinas formam um complexo enzimático, onde as CDKs conduzem as células através das fases do ciclo, alterando a estrutura e função de outras proteínas, enquanto as ciclinas tem o papel principal de “ligar e desligar” as CDKs. Em mamíferos, mais de 20 membros de CDKs foram descritas, no entanto, foi demonstrado a participação direta ou indireta na divisão celular de poucos complexos ciclina-CDK (HYDBRING; MALUMBRES; SICINSKI, 2016).

Os complexos ciclina-CDK tem funções distintas durante as fases do ciclo celular. Em eucariotos, no início de G1, sinais extracelulares modulam a ativação de CDK4 e CDK6 associados com ciclinas do tipo D. Esses complexos fosforilam e inativam a proteína retinoblastoma (pRb), resultando na liberação de fatores de transcrição, os quais controlam a expressão de genes necessários para a transição G1/S e progressão da fase S. O complexo CDK2-ciclina é responsável pela transição G1/S e pela regulação da duplicação do centrôssomo: ciclinas do tipo E são super reguladas e ativam CDK2, resultando na fosforilação de várias proteínas relacionadas ao ciclo celular. Já durante a fase S, a ciclina A juntamente com CDK1 ou CDK2 fosforila várias proteínas envolvidas na replicação do DNA, além de inativar fatores de transcrição relacionados a G1. O complexo CDK1-ciclina A também atua na transição S/G2. O complexo CDK1-ciclina B ativa a transição G2/M através da fosforilação de substratos chamados de complexo promotores de anáfase, o que resulta na transição da anáfase para mitose (Figura 1). A sucessiva montagem e degradação dos complexos CDK-ciclina são altamente regulados por modificações pós traducionais e translocações. Todo o processo é coordenado e dependente do passo anterior para continuidade (HARASHIMA; DISSMEYER; SCHNITTGER, 2013; HYDBRING; MALUMBRES; SICINSKI, 2016).

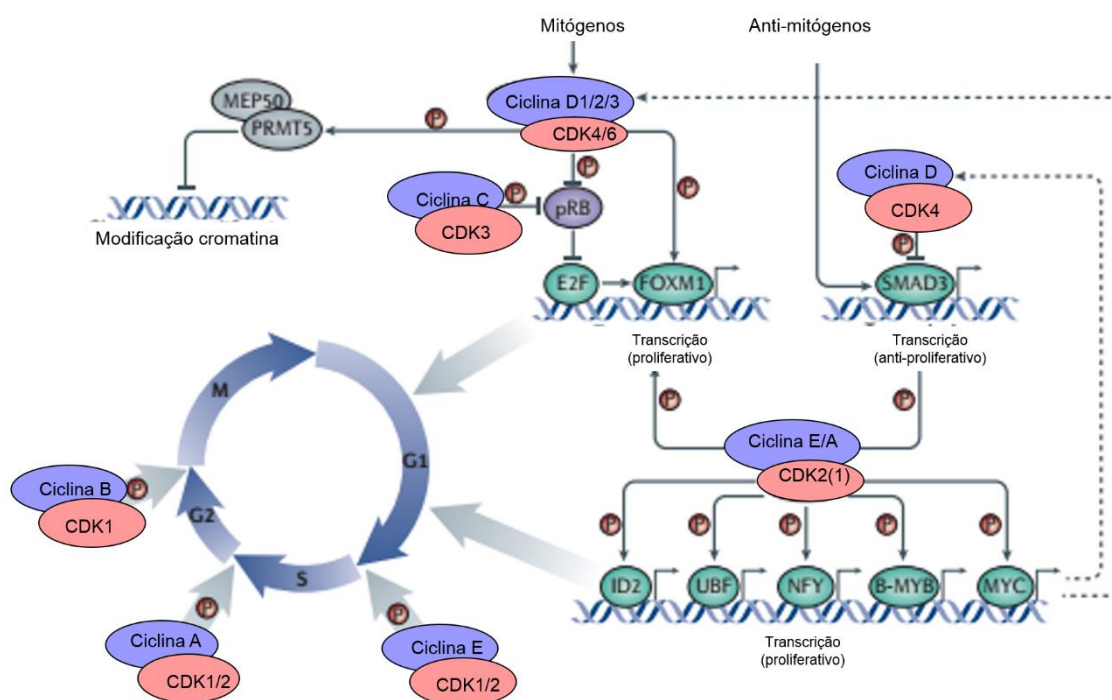


Figura 27- Envolvimento de ciclinas e quinasas dependentes de ciclina no ciclo de divisão celular. A progressão do ciclo celular é direcionada por complexo heterodímeros formados pelas ciclinas D, E, A ou B e quinasas dependentes de ciclinas 4, 6, 2 ou 1. O início do ciclo é devido a formação do complexo CDK4/6-ciclina D em resposta a estímulos de mitógenos. Este complexo fosforila e inativa parcialmente pRB, liberando fatores de transcrição, como E2F. Em seguida, E2F promove a expressão de múltiplos genes relacionados ao ciclo de divisão, entre eles, o que codifica ciclina E que se liga e ativa CDK1 e CDK2. A ativação das CDKs 1 e 2 por ciclinas do tipo A e E levam à fosforilação de vários fatores de transcrição: ID2 (proteína inibidora de ligação do DNA 2), UBF (upstream binding factor), NFY (fator nuclear Y), B-MYb e MYC. O complexo CDK4-ciclina D também fosforila modificadores de cromatina que promovem a repressão de genes com propriedades anti-proliferativas. Vários complexos podem fosforilar o fator de transcrição SMAD3, o qual é ativado por anti-mitógenos, a fim de promover a progressão do ciclo. A entrada na fase de mitose é especificamente regulada pelo complexo CDK1-ciclina B. As linhas pontilhadas indicam relações indiretas ou com vários passos. Modificado de HYDBRING; MALUMBRES; SICINSKI, 2016.

O envolvimento das CDKs mostradas na figura 1 no ciclo de divisão celular é descrito e bem estabelecido. No entanto, vale ressaltar que a maioria dos dados sobre os mecanismos moleculares do processo foram baseados em poucos organismos, como fungos *Saccharomyces cerevisiae* e *Schizosaccharomyces pombe*, camundongos *Mus musculus*, mosca da fruta *Drosophila melanogaster*, nematoides *Caenorhabditis elegans* e linhagens celulares humanas. Dessa forma, para alguns organismos, o controle e regulação do ciclo celular não estão completamente elucidados (DE LICHTENBERG et al., 2007; HARASHIMA; DISSMEYER; SCHNITTGER, 2013).

2.2 Ciclo celular em Tripanosomatídeos

Os mecanismos que controlam a divisão celular na replicação do DNA, no crescimento celular, na mitose e na interação de moléculas expressas em diferentes fases do ciclo, têm sido extensivamente estudados em organismos modelos (DE LICHTENBERG et al., 2007; HARASHIMA; DISSMEYER; SCHNITTGER, 2013). No entanto, pouco se sabe sobre a duplicação e a segregação de organelas e as moléculas envolvidas na progressão do ciclo celular em tripanosomatídeos.

A maior parte dos eucariotos possuem várias cópias da mesma organela enquanto os tripanosomatídeos possuem organelas em cópia única, como núcleo, complexo de Golgi, mitocôndria, cinetoplasto (contendo genoma mitocondrial), corpo basal e flagelo (HE et al., 2004). O núcleo dos tripanosomatídeos tem estrutura similar à de outros eucariotos, no entanto o envelope nuclear permanece intacto durante o ciclo celular. Apesar das semelhanças, as alterações morfológicas durante o ciclo celular são distintas em espécies de tripanosomatídeos, principalmente quanto a posição do cinetoplasto e inserção do flagelo (ELIAS et al., 2007; ARAUJO et al., 2014). Ademais, a coordenação da replicação do DNA do cinetoplasto e do núcleo é diferente em relação aos demais eucariotos, visto que o DNA mitocondrial se replica em qualquer estágio do ciclo celular (LIU et al., 2005; WHEELER; GLUENZ; GULL, 2011; DA SILVA et al., 2013b). Em *T. cruzi*, durante a mitose, o núcleo se torna alongado e homogêneo, com a cromatina e nucléolos dispersos. Posteriormente, a cromatina migra para a região polar do núcleo, acarretando a divisão nuclear durante a citocinese (DE SOUZA, 2009; ARAUJO et al., 2014). Espécies de *Leishmania* não replicam o DNA nuclear nem mitocondrial na mesma ordem que *T. brucei*, espécie em que as alterações estão melhores descritas e bem elucidadas (WOODWARD; GULL, 1990). Para *L. mexicana*, foi demonstrado que as alterações durante a progressão do ciclo são similares a de outros tripanosomatídeos (WHEELER; GLUENZ; GULL, 2011), isto é, o tamanho do corpo celular e do flagelo aumentam durante G1 e permanecem constantes durante a fase S; o novo flagelo emerge da bolsa flagelar no final da fase S, sendo

de tamanho diferente na célula filha. O modelo das alterações morfológicas durante a divisão celular em promastigotas de *L. mexicana* pode ser visto na Figura 2.

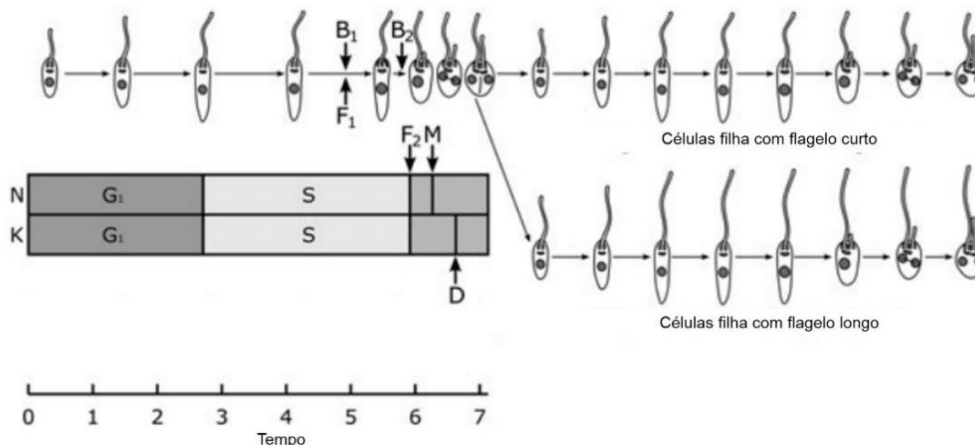


Figura 28- Ciclo celular em promastigotas de *L. mexicana*. Representação dos principais eventos morfológicos durante o ciclo celular e do tempo de síntese e divisão do núcleo (N) e do cinetoplasto (K). B₁: tempo aproximado para a formação do corpo basal; B₂: rotação do corpo basal; F₁: extensão do axonema; M: segregação do DNA durante a anáfase mitótica; D: divisão do cinetoplasto; F₂: novo flagelo a partir da bolsa flagelar. Modificado de WHEELER; GLUENZ; GULL, 2011.

Em relação as moléculas envolvidas na regulação do ciclo celular em *Leishmania*, foram identificadas inicialmente, duas proteínas relacionadas a quinases dependentes de ciclina (CRK- *cdc2-related kinase*), CRK1 e CRK3 (MOTTRAM et al., 1993; GRANT et al., 1998). O gene *CRK3* de *L. mexicana* codifica a proteína quinase relacionada a *cdc-2* e tem atividade na fase G2:M, a qual é caracterizada por sofrer modificações pós traducionais estágio específicas, sendo ativas em estágios proliferativos (amastigotas e promastigotas), mas não na forma não proliferativa (promastigotas metacíclica) (GRANT et al., 2004; DUNCAN et al., 2016). *CRK3* de *L. mexicana* codifica uma proteína quinase de aproximadamente 35 kDa, com 54% de identidade com a CDK1 humana e 78% com CRK3 de *T. brucei* (HASSAN et al., 2001). A proteína CRK3 de tripanosomatídeos tem a região N-terminal pouco conservada, não presente na *cdc2* humana. O gene *CRK3* é cópia única com 5 vezes mais mRNA nas formas promastigotas que em metacíclicas, indicando que é mais expresso nessa forma do ciclo evolutivo (GRANT et al., 2004; DUNCAN et al., 2016).

Apesar de existirem outras CRKs descritas em tripanosomatídeos, até o momento, foram descritas somente dois complexos essenciais para a progressão do ciclo celular: o complexo CRK3-ciclina (CRK3:CYC6 e CRK3:CYC2), essencial para G2:M e progressão de G1, respectivamente. O envolvimento destas CRKs no ciclo celular é complexo, com diferentes funções entre as diferentes formas dos tripanosomatídeos, como demonstrado por técnicas de silenciamento de gene por RNAi em *T. brucei* e deleção condicional de gene em *L. mexicana* (HASSAN et al., 2001; GOURGUECHON; SAVICH; WANG, 2007; GOMES et al., 2010; JONES et al., 2014; DUNCAN et al., 2016).

A capacidade de proliferação dos organismos unicelulares é um dos pontos chave para sobrevivência, sendo assim, o ciclo celular pode ser considerado um alvo antiparasitário ideal (GRANT, 2008). Existem diferenças entre a divisão dos parasitos e da célula hospedeira o que permite obter seletividade quando o ciclo celular é o alvo de substâncias. Muitas das manifestações clínicas causadas por protozoários parasitas estão associadas à rápida multiplicação celular, como por exemplo, as ondas febris e anemia associadas ao estágio intra-eritrocítico de *Plasmodium* (STEVENSON et al., 2001). De fato, fármacos anticâncer se baseiam no mesmo princípio, sendo muitos dos novos fármacos desenvolvidos e em testes baseados na inibição de reguladores do ciclo celular, como as CDKs (OTTO; SICINSKI, 2017). Assim, as CDKs são cruciais para progressão, controle e coordenação do ciclo celular, o que justifica as pesquisas a fim de elucidar suas funções e encontrar inibidores.

2.3 Proteínas quinases como alvo terapêutico

Em geral, as proteínas quinases são alvos quimioterápicos promissores. Isso se deve ao fato da fosforilação ser uma das formas mais comuns de modificação pós-traducional reversível, o qual é controlada por quinases e fosfatases que adicionam e removem grupos fosfato das proteínas (Figura 3) (KHOURY; BALIBAN; FLOUDAS, 2011).

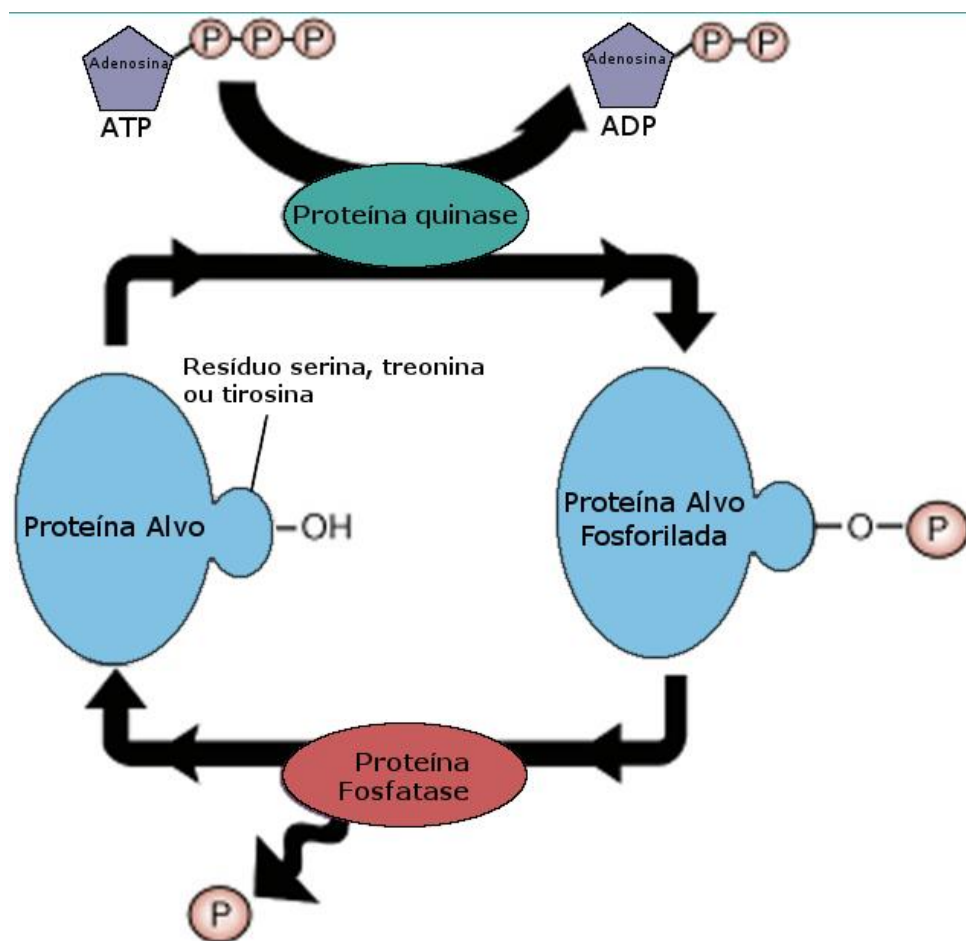


Figura 29- Ciclo catalítico de fosforilação proteica por uma quinase. A proteína quinase faz a mediação da transferência do fosfato (P) de uma adenosina trifosfato (ATP) para os grupos hidroxila (OH) presente em resíduos de serina, treonina ou tirosina da proteína alvo. A fosforilação atua como um interruptor molecular, o qual ativa direta ou indiretamente a proteína alvo. Por outro lado, a proteína fosfatase atua com efeito reverso ao da quinase, catalisando a remoção do fosfato da proteína alvo. Modificado de PATTERSON et al., 2014.

As vias de sinalização de quinase direcionam importantes alterações celulares, por exemplo, na biologia de tumores: proliferação, motilidade, metabolismo, sobrevivência e respostas imunológicas (HANAHAN; WEINBERG,

2011). Atualmente, vários inibidores de quinases com alta seletividade e eficácia estão no mercado farmacêutico ou sendo avaliados em testes clínicos (COHEN; ALESSI, 2013; GROSS et al., 2015). Imatinib (Gleevec®) é um exemplo de desenvolvimento racional de fármaco baseado em alvos moleculares para o tratamento de câncer. É utilizado para inibir o complexo BCR-ABL1 tirosina quinase o qual, quando ativo, fosforila o substrato e induz a leucemia mieloide crônica (DRUKER, 2004). Além disso, inibidores de proteínas quinases são utilizados para tratamentos de doenças autoimunes como artrite reumatoide, psoríase e doença de Crohn (PATTERSON et al., 2014).

Considerando as CDKs, uma série de inibidores foram descritos tais como roscovitina, flavopiridol e indurubina (LOSIEWICZ et al., 1994; MEIJER et al., 1997; GRANT et al., 2004; GRANT, 2008). Todos estes competem com o ATP pelo sítio catalítico. Como moléculas citotóxicas, os inibidores de CDK tem maior efeito em tumores, visto que estes se dividem mais rápido que células normais. Considerando os parasitos também como células proliferativas não desejadas no interior do hospedeiro, pode-se esperar o mesmo efeito tóxico com uso de inibidores de CDKs frente à doenças parasitárias (GRANT et al., 2004).

2.3.1 *Proteínas quinases de Leishmania*

Como dito anteriormente, o uso de inibidores de proteínas quinases em mamíferos é uma prática terapêutica bem estabelecida. Fato este que abre caminho para o uso de inibidores de quinases em outros organismos, como protozoários parasitas. A busca por inibidores de quinases de tripanosomatídeos vem aumentando, representando uma importante área para a identificação de substâncias anti-*Leishmania* (MOTTRAM et al., 1993; GRANT et al., 2004; GOMES et al., 2010; SANDERSON; YARDLEY; CROFT, 2014). Várias proteínas quinases de *Leishmania* já foram identificadas e algumas relatadas como essenciais para a sobrevivência do parasito. Algumas delas são as proteínas quinases ativadoras de mitógenos (MAPK - *mitogen activated protein kinases*) e as proteínas quinases dependentes de ciclina (CDK). A primeira está relacionada a sinalização celular e é essencial para infecção e sobrevivência do parasita no hospedeiro e a segunda é homóloga a quinase de mamífero cdc2, relacionada ao ciclo celular (MOTTRAM

et al., 1996; WIESE, 1998; HASSAN et al., 2001; CAYLA et al., 2014). Em especial, a proteína quinase relacionada a CDK (CRK3) tem sido extensivamente estudada pelo grupo de pesquisa do Professor Jeremy Mottram a fim de compreender a sua função e participação em todas as fases do ciclo do parasito e buscar moléculas inibidoras (GRANT et al., 2004; CLEGHORN et al., 2011; WALKER et al., 2011; DUNCAN et al., 2016).

Com o sequenciamento do genoma de *L. major*, foi possível identificar, baseado em análises de bioinformática e comparação com os genomas de *T. brucei* e *T. cruzi*, 179 proteínas quinases também presentes em eucariotos (ePKs) e outras 16 atípicas compondo o quinoma de *Leishmania* (IVENS et al., 2005; PARSONS et al., 2005). Assim como o quinoma humano, o de *Leishmania* compreende apenas 2% do genoma total, no entanto, existem menos Pks presentes no genoma de *Leishmania*, e muitos dos grupos de ePKs não estão presentes em *L. major*. A presença de várias quinases atípicas em *Leishmania* representa a necessidade de elucidar a função destas a fim de permitir sua utilização como novos alvos (NAULA; PARSONS; MOTTRAM, 2005; PARSONS et al., 2005).

Outras informações sobre as funções das PKs em *Leishmania* irão permitir identificar reguladores chave do ciclo celular e diferenciação, processos essenciais para proliferação do parasito e infecção. Os dados que demonstram PKs como bons alvos terapêuticos estimulam a busca por inibidores específicos de proteínas quinases de *Leishmania*, os quais levariam a fármacos mais eficientes e sem efeitos colaterais. Os avanços nas técnicas de regulação da expressão gênica e testes de substâncias em larga escala contra estes alvos, poderão permitir a descoberta de novos fármacos antiparasitários (DUNCAN et al., 2016).

O fator limitante para análise em larga escala do quinoma de *Leishmania* é a ausência de metodologias efetivas (DUNCAN et al., 2016). Por exemplo, utilizando silenciamento de genes por RNAi, foram avaliadas 190 PKs de *T. brucei*, identificando quais são essenciais para infecção e proliferação (JONES et al., 2014). No entanto, esta metodologia baseada em RNAi não é viável em espécies de *Leishmania*, visto que não apresentam a maquinaria genética utilizando este RNA. Devido a conservação das PKs entre tripanosomatídeos, é possível extrapolar os dados obtidos para *T. brucei* e selecionar quinases possíveis para alvos quimioterápicos em espécies de *Leishmania*.

2.4 *Leishmania*: Manipulação Genética

A possibilidade de cultivo *in vitro* de formas promastigotas de espécies do gênero *Leishmania* para estudos da biologia e doença é realidade há mais de 40 anos (BERENS; BRUN; KRASSNER, 1976). Os métodos de cultivo atuais permitem a exploração de vários aspectos biológicos de *Leishmania* durante o seu complexo ciclo de vida, como regulação da expressão gênica, expressão proteica e as alterações metabólicas durante a diferenciação. Apesar destes modelos estarem bem estabelecidos há anos, alguns modelos de estudo ainda são limitados. Somente na década de 1990 foi descrito o estudo de engenharia genética em *Leishmania major*, demonstrando recombinação homóloga no parasito (CRUZ; BEVERLEY, 1990). Este método se baseia na clonagem do gene em um vetor com gene de resistência a antibióticos específicos, flanqueado por regiões homólogas do gene alvo, amplificado do DNA genômico por PCR. Após digestão por enzimas de restrição, o vetor é transfectado em formas promastigotas e através da seleção por resistência ao antibiótico, os parasitos contendo o gene alvo são selecionados. Esta seleção resulta em transferência vertical de genes após sucessivas replicações do parasito, obtendo assim, a população clonal alterada geneticamente (CRUZ; BEVERLEY, 1990).

Uma das limitações da manipulação genética é a transferência de material gênico entre os parasitos. Tem sido demonstrado transferência de material genético inter e intra específica em promastigotas de *Leishmania* presentes no flebotomíneo (INBAR et al., 2013; ROMANO et al., 2014). Ainda, isolados híbridos de *L. major* e *L. infantum* comprovam a existência de recombinação sexual em espécies do gênero (RAVEL et al., 2006). Apesar da evidência de recombinações ocorrendo naturalmente, culturas de *Leishmania* mantidas *in vitro* com população clonal sobre pressão seletiva de drogas podem ser mantidas sem alteração. Devido a esta característica, vários genes têm sido substituídos e cepas mutantes geradas permitindo analisar diferentes aspectos biológicos e de patogenicidade do parasito.

Outra vantagem do modelo é a possibilidade de utilizar formas infectivas (metacíclicas) com genes silenciados em infecção de camundongos, a fim de avaliar se a deleção do gene altera a virulência e o processo infeccioso (ALEXANDER; COOMBS; MOTTRAM, 1998; DENISE et al., 2003). Ainda por

métodos de deleção de genes, também foi possível identificar proteínas essenciais para sobrevivência *in vivo* ou que alteram drasticamente a resposta imune do hospedeiro durante a infecção (BUXBAUM et al., 2003; WANG et al., 2005; FARIA et al., 2011). Uma limitação do método de reposição e deleção de genes, é quando se trata de genes que codificam para proteínas essenciais à viabilidade do parasito. Assim, os clones gerados apresentam alterações fenotípicas e estruturais que impedem a análise e execução de experimentos. Além disso, os parasitos podem replicar todo o genoma ou alterar a estrutura, resultando em parasitos com aneuploidia ou tetraploidia (CRUZ; TITUS; BEVERLEY, 1993).

Atualmente, métodos de manipulação genética em *Leishmania* tem sido aperfeiçoados e modernizados a fim de diminuir as limitações do modelo proposto. Uma ferramenta que permitisse a regulação da expressão de genes, seria de grande valia, visto que auxiliaria na análise da função de proteínas e entendimento dos fenótipos observados. Além disso, a possibilidade de regular proteínas essenciais para o parasito seria uma ferramenta crucial na busca alvos terapêuticos e fármacos (YAN; MYLER; STUART, 2001; DUNCAN et al., 2016).

2.5 Superexpressão de proteínas

Existe uma grande variedade de mecanismos moleculares que controlam os níveis de expressão gênica, fazendo com que sejam expressos em nível apropriado em uma determinada condição. A redução da expressão ou deleção de genes abaixo de limites críticos acarreta em alterações fenotípicas visíveis e esperadas. De outro modo, o aumento da expressão de genes também altera uma célula ou organismo. Ou seja, o equilíbrio e a estabilidade de moléculas são necessários para manutenção do sistema biológico (PRELICH, 2012; ARNOLDO et al., 2014). Como exemplo da superexpressão e a alteração do fenótipo celular, foi revisto por PRELICH (2012), a superexpressão de genes como HER2, MYC e REL está relacionada com aparecimento de câncer. Além disso, superexpressão natural devido à amplificação de genes pode resultar em resistência a fármacos e inseticidas. Nesse sentido, a indução de superexpressão intencional de genes individuais é uma ferramenta viável na elucidação de mecanismos biológicos e funções de proteínas (PRELICH, 2012).

A utilização de sistemas de superexpressão começou após o desenvolvimento de técnicas moleculares em leveduras. Desde então, observa-se diferentes trabalhos buscando alvos de substâncias utilizando superexpressão de genes. De fato, quando um gene é superexpresso ele pode conferir resistência ao tratamento, o que sugere o mecanismo de ação da substância (PRELICH, 2012; ARNOLDO et al., 2014; BEGOLO; ERBEN; CLAYTON, 2014).

No início da década de 1970 foi demonstrado, pela primeira vez, a possibilidade de inserção de gene em plasmídeo, onde o cassete com o gene de resistência a estreptomicina foi funcional em plasmídeo bacteriano resistente à tetraciclina (COHEN et al., 1973). O mesmo grupo também clonou o gene de dihidrofolato redutase de camundongo em um plasmídeo com resistência a trimetoprima em *E. coli*, relato inicial de clonagem heteróloga (CHANG et al., 1978).

Em 1983, utilizando abordagem em larga escala de superexpressão de vários genes de levedura, Rine e colaboradores (1983) identificaram genes que revertiam o efeito dos inibidores mevastatina, etionina e tunicamicina, validando o conceito de dosagem do gene para descobrimento de alvos quimioterápicos em eucariotos, onde a maior concentração do gene alvo reverte o efeito tóxico da substância (RINE et al., 1983). Além disso, demonstrou-se que a superexpressão de vários genes (biblioteca de superexpressão) pode ser utilizada para identificar fenótipos em células não mutadas (selvagens) (PRELICH, 2012). Recentemente, foi reportado um método de superexpressão para avaliação simultânea de milhares de genes, o qual permitiu a identificação de mecanismos de ação de drogas anti-tumorais. Os autores utilizaram a superexpressão de 12,200 ORFs humanas (ORF- *open reading frame* - fase de leitura aberta), representando 12,214 genes em células HEK293 (linhagem humana de rim embrionário). O método foi validado e utilizado para confirmar os alvos de 7 diferentes substâncias (ARNOLDO et al., 2014).

Um dos diferenciais da metodologia proposta por Arnoldo e colaboradores (2014) é a possibilidade de controlar a expressão do gene de interesse, o que permite que a expressão do gene seja “ligada e desligada”. Um sistema extensivamente utilizado, tanto *in vivo* quanto *in vitro*, é a utilização de expressão induzida por tetraciclina (Tet) (SUN; CHEN; XIAO, 2007; LOEW et al., 2010). A descrição do sistema inicial foi reportado em 1992, e permite não só o controle da

expressão de genes ou trans genes em células de mamíferos, como também geração do modelo "on/off" de forma reversível (GOSSEN; BUJARD, 1992). O mecanismo da regulação transcricional é baseado na família de proteínas exportadoras de tetraciclina (Tet), responsáveis pela resistência de bactérias Gram-negativas ao antibiótico (BERENS; HILLEN, 2003).

A resistência à Tet se deve à expressão da proteína de membrana TetA, a qual deve ser altamente controlada, já que sua expressão na ausência do antibiótico é tóxica para a bactéria. Em bactérias entéricas, o gene *tetA* é regulado em nível transcricional pelo repressor de tetraciclina (TetR). Esta proteína tem alta afinidade pelo operador tet (*tetO*), reprimindo a expressão do próprio gene e de *tetA*. Assim que Tet entra na célula, esta se liga ao TetR, induzindo alteração conformacional e dissociação do *tetO*, permitindo a expressão de TetA e TetR. Assim, a tetraciclina é eliminada do citoplasma e essa diminuição leva a inibição da expressão dos genes novamente. Este mecanismo de resistência altamente regulado foi a base para o controle da expressão gênica em procariontes e eucariontes (BERENS; HILLEN, 2003).

Existem dois tipos de expressão induzida por tetraciclina (Figura 4), o *Tet-on*, onde a expressão é iniciada após a adição do indutor, e *Tet-off* onde ocorre o oposto, a expressão é reprimida após adição do indutor, em ambos os casos é utilizada a tetraciclina como agente indutor, ou análogos como doxiciclina (GOSSEN; BUJARD, 1992; GOSSEN et al., 1995; NIE; WEN; SUN, 2007; LOEW et al., 2010). No sistema *Tet-on*, na ausência de tetraciclina, dímeros da proteína repressora de tetraciclina (TetR) se ligam fortemente ao operador tet localizado no promotor do gene de interesse, impedindo a transcrição. Ao adicionar Tet, esta se liga a TetR, ocorre alteração estrutural e se dissocia do *tetO*, permitindo a transcrição. O TetR é um bom repressor quando utilizado em alguns eucariontes e plantas, mas não é eficiente quando se trata de células de mamíferos. Neste caso o sistema *Tet-off* é mais vantajoso. Pode ser utilizado o repressor de tetraciclina reverso, o qual se liga ao *tetO* na presença de Tet, ao remover o antibiótico a expressão é iniciada novamente (BERENS; HILLEN, 2003; LOEW et al., 2010; EVANS; MIZRAHI, 2015).

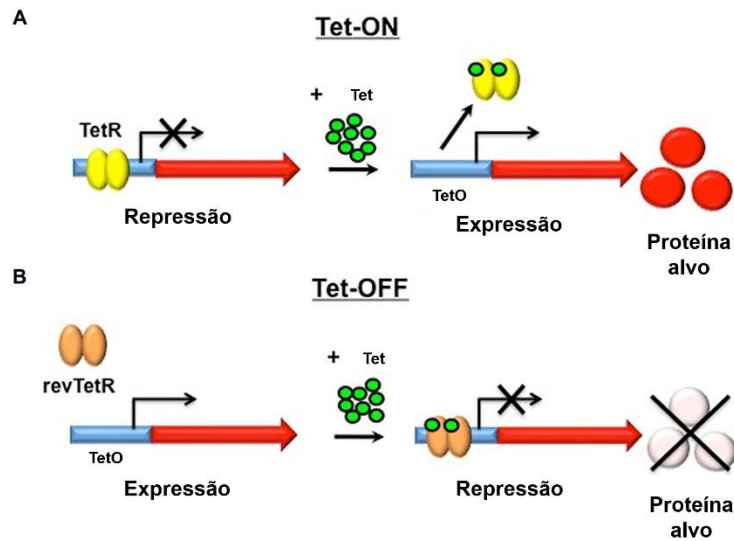


Figura 30- Desenho esquemático da regulação da expressão por tetraciclina. No sistema chamado Tet-ON, proteínas TetR se ligam ao tetO na ausência de Tet, inibindo a transcrição do gene de interesse. Após a adição de Tet, esta se liga ao TetR ocasionando a dissociação do TetR do tetO, permitindo a expressão. Por outro lado, no Tet-OFF, após a indução com Tet esta se liga ao TetR híbrido (revTetR), permitindo a transcrição. TetR: repressor de tetraciclina; Tet: tetraciclina; revTetR: repressor de tetraciclina modificado; tetO: operador tet. Modificado de EVANS; MIZRAHI, 2015.

Atualmente a expressão induzida e controlada por Tet é utilizada em inúmeros organismos, incluindo anfíbios, insetos, mamíferos, fungos, plantas e protozoários. No caso de tripanosomatídeos, foi descrito o sistema baseado no operador tet em *T. brucei*, com o promotor PARP (proteína repetitiva procíclicas ácida - *procyclic acidic repetitive protein*) que naquele momento era um dos poucos promotores bem descritos em *T. brucei*. O promotor PARP guia a expressão tanto de luciferase quanto do gene de resistência, no caso higromicina. O vetor foi inserido no *locus* de tubulina e após o aumento da concentração de Tet a expressão de luciferase aumenta significativamente, quando comparado à não induzida (WIRTZ; CLAYTON, 1995). Em *Leishmania donovani* também foi descrito o controle da expressão baseado em Tet, onde o sistema permite que o gene seja super ou sub expresso de forma regulada. Assim como no sistema em *T. brucei*, os autores utilizaram o gene de luciferase como gene repórter a fim de quantificar e comparar a expressão (YAN; MYLER; STUART, 2001).

Mais recentemente, foi utilizado uma biblioteca de superexpressão de genes de *T. brucei* como ferramenta para sugestão do alvo de substâncias anti-tripanosoma (BEGOLO; ERBEN; CLAYTON, 2014). Os autores utilizaram cepas de

T. brucei expressando diferentes fragmentos de proteínas após indução com Tet. Para validar a utilização a biblioteca gerada para identificar alvos, utilizaram duas substâncias com alvos já conhecidos: difluorometilornitina (DFMO), utilizado no tratamento de tripanossomíase africana (HAT), que atua na enzima ornitina descarboxilase (ODC); e DDD85646, que tem como alvo a N-niristoiltransferase (BEGOLO; ERBEN; CLAYTON, 2014; ERBEN et al., 2014). A metodologia empregada foi capaz de identificar com sucesso o alvo das substâncias utilizadas, confirmando a utilidade e eficiência desse tipo de ferramenta para elucidação de alvos moleculares. O esquema resumindo o método pode ser visto na figura 5.

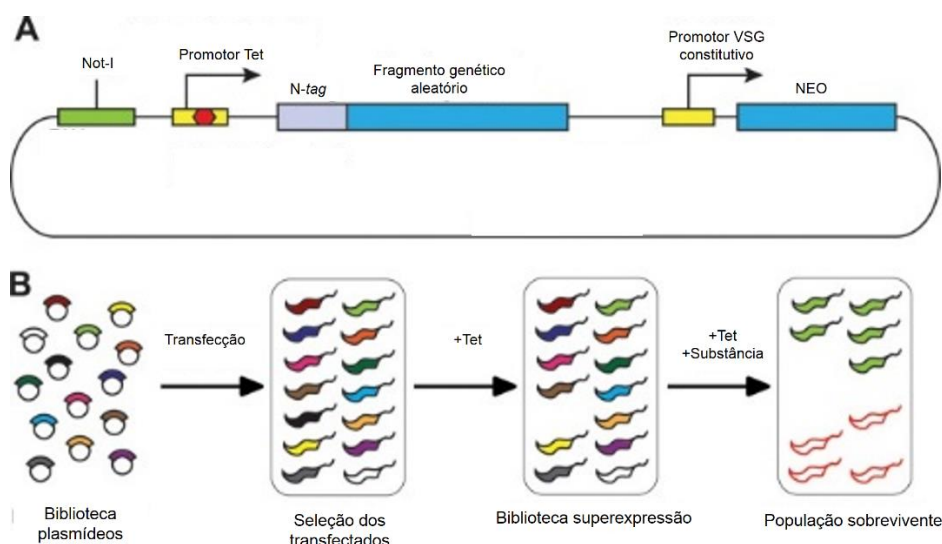


Figura 31 - Esquema do método de superexpressão para descoberta de alvos de fármacos em *T. brucei*. (A) Representação esquemática do plasmídeo de superexpressão contendo o fragmento genômico aleatório. Nota-se que o fragmento está ligado a um repórter na região N-terminal. Após a transfecção, os parasitos são selecionados através da resistência a neomicina (NEO). O plasmídeo linearizado com a enzima de restrição NotI é integrado na região rRNA. (B) Representação do método de varredura de alvos quimioterápicos. A biblioteca de plasmídeos foi transfectada em formas sanguíneas de *T. brucei* e os transfectantes selecionados pela resistência a neomicina. Posteriormente, os parasitos foram induzidos com adição de Tet e somente as células expressando peptídeos não tóxicos sobreviveram. Após 24 h de indução, foi adicionado a substância teste (substância) e a população sobrevivente selecionada após alguns dias. A população sobrevivente é composta de parasitos superexpressando o alvo (parasitos verdes) e outros parasitos (delimitados vermelho) que adquiriram vantagem após pressão seletiva. Modificado de BEGOLO; ERBEN; CLAYTON, 2014.

Apesar dos modelos exemplificados acima serem de grande valia para avaliações fenotípicas eles apresentam desvantagens. Por exemplo, no modelo para *T. brucei*, o gene de resistência e o gene de interesse eram dependentes do mesmo promotor, portanto, para seleção das cepas, Tet tinha que ser mantido no meio de cultura. Assim, não era possível o controle da expressão. O mesmo grupo aperfeiçoou o modelo e criou um sistema no qual o gene de interesse tem um promotor controlável e o gene de resistência, um promotor constitutivo. Ainda, para evitar a regulação endógena da expressão pela polimerase do tripanosoma, foi utilizado a expressão de T7 RNA polimerase. As cepas modificadas obtidas após a inserção dos vetores têm então a transcrição do TetR ligada ao promotor da T7 polimerase de bacteriófago. O modelo co-expressando TetR-T7 permite a obtenção de cepas de maneira eficiente, na ausência de Tet e nas formas sanguíneas e procíclicas do parasito (WIRTZ et al., 1999).

O gene codificante para T7 RNA polimerase proveniente do fago foi clonado há décadas e ainda hoje é utilizado para controle de expressão em inúmeros tipos celulares, de bactérias a células de mamíferos (DAVANLOO et al., 1984; BORGEAUD; BLOKESCH, 2013). Já foi demonstrado que espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma* traduzem de maneira eficiente a T7 e T3 polimerase (WIRTZ; HARTMANN; CLAYTON, 1994).

O aperfeiçoamento e alterações nos sistemas de superexpressão são necessários e visam aumentar a efetividade e o uso em diferentes organismos. O auto nível de superexpressão de proteínas heterólogas ou não, altera a fisiologia do organismo, levando-o a subregulação da expressão por via de controles transcricionais próprios. Portanto, o uso de T7 polimerase de bacteriófago é uma ferramenta capaz de contornar esta subregulação, já que não pode ser controlada pela maquinaria transcricional do hospedeiro. Além disso, garante a transcrição do DNA ligado ao promotor T7, pois tem alta especificidade com esses (DAVANLOO et al., 1984; WIRTZ et al., 1999; KUSHNIR et al., 2005; BORGEAUD; BLOKESCH, 2013). Ainda, tanto o rRNA quanto o promotor T7 podem ser controlados pelo repressor Tet em tripanosomatídeos (WIRTZ et al., 1999).

O sistema de expressão induzida não é utilizado somente para entendimento da biologia dos organismos ou como ferramentas para a descoberta de novos fármacos. A expressão heteróloga de proteínas é também uma importante

alternativa ao isolamento de proteínas (BREITLING et al., 2002). Vários sistemas de expressão proteica utilizam bactérias, células de insetos, fungos, leveduras, plantas, entre outros (BREITLING et al., 2002; LAMBERTZ et al., 2014). Apesar da variedade de organismos e sistemas, nenhum deles pode ser aplicado para todos os tipos de proteínas. As vantagens e desvantagens de cada sistema foi revisto recentemente por Gomes e colaboradores (2016), no entanto, os autores não mencionam a utilização de organismos da família *Tripanosomatidae* (GOMES et al., 2016).

Os organismos patogênicos *Tripanosomatidae* são os protozoários melhores caracterizados sobre aspectos moleculares e genéticos, mesmo assim muitas das rotas metabólicas e maquinaria genética ainda não estão completamente elucidadas. Sabe-se que estes organismos apresentam características únicas quando se trata de edição de RNA, arranjo de genes em paralelo, transcrição policistrônica, *trans-splicing*, e regulação da maior parte das proteínas por modificações pós-traducionais (COHEN-FREUE et al., 2007; CLAYTON, 2016). Devido a estas características únicas, os tripanosomatídeos são uma alternativa a expressão heteróloga de proteínas. Estudos prévios demonstraram que espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma* produzem proteínas e citocinas humanas, como P53, e IL-2 ativas (TOBIN et al., 1993; LA FLAMME et al., 1995). No entanto, algumas dessas espécies apresentam baixa taxa de crescimento e risco à saúde humana quanto a manipulação.

Dentre os tripanosomatídeos, *Leishmania tarentolae*, espécie parasita de lagarto (KUSHNIR et al., 2005) é um modelo de sistema eficiente e apropriado para expressão de proteínas de mamíferos. Esta espécie não é capaz de infectar humanos, não estando sujeita às regras de biossegurança exigidas no cultivo de tripanosomatídeos parasitas como *L. mexicana*, *T. brucei* e *T. cruzi*. Breitling e colaboradores (2002) clonaram o gene de eritropoietina humana (hEPO), proteína amplamente utilizada em tratamentos, utilizando *L. tarentolae*. O vetor com o gene de interesse foi integrado na região ribossomal de *L. tarentolae* e a proteína secretada foi biologicamente ativa, confirmando a conformação correta de hEPO (BREITLING et al., 2002). Outros grupos confirmaram que *L. tarentolae* tem uma maquinaria de expressão protéica com modificações pós-traducionais, incluindo

glicosilação (BREITLING et al., 2002; DORTAY; MUELLER-ROEBER, 2010; NIIMI, 2016).

Como mencionado anteriormente, a expressão de proteínas pode ser controlada pelo organismo, a fim de evitar produtos tóxicos. Em 2005, Kushnir e colaboradores, utilizaram o sistema baseado em TetR e T7 polimerase para aperfeiçoar a expressão em *L. tarentolae* (KUSHNIR et al., 2005). Foi criada uma cepa de *L. tarentolae* co-expressando o repressor de tetraciclina e T7 polimerase. O gene heterólogo é clonado sob controle dos promotores T7/TetR (Figura 6). Atualmente, a utilização de *L. tarentolae* é um sistema de produção de proteínas comercial (Lexsy), vendido por Jena Bioscience e conta com opções de expressão induzida, constitutiva e epissomal (<https://www.jenabioscience.com/lexsy-expression>).

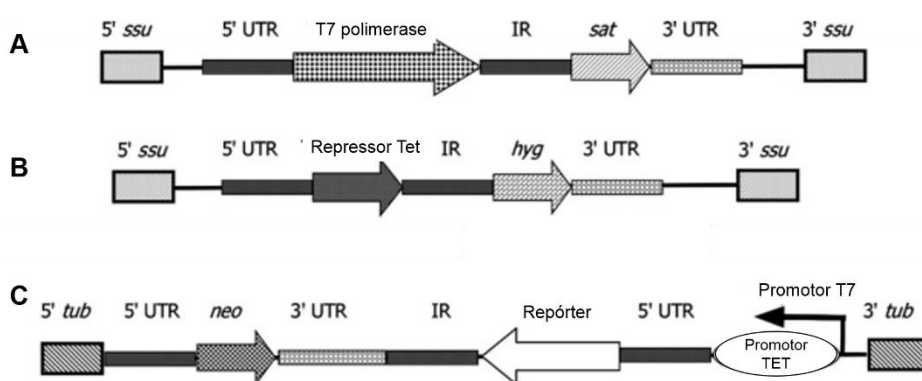


Figura 32 - Representação esquemática dos vetores utilizados na cepa gerada de *L. tarentolae*. (A) Cassete de T7 polimerase integrado no locus ssu ribossomal. (B) Cassete de repressor de Tet integrado no locus ssu ribossomal. (C) Representação do cassete com o gene reporter (EGFP) controlado por T7 e Tet promotor integrado no locus de tubulina em orientação anti-senso. Modificado de KUSHNIR et al., 2005.

O ciclo celular de *L. tarentolae* é pouco estudado e a espécie não apresenta relevância médica. Dessa forma, o sistema criado foi extrapolado para utilização em *L. mexicana*, agente etiológico da leishmaniose cutânea (KRAEVA et al., 2014). Os autores utilizaram vetores de TetR e T7 polimerase que integram na região ribossomal e são expressos constitutivamente. Para inserção do gene de interesse foi utilizado um vetor que se integra no locus β -tubulina em sentido anti-senso. Vale ressaltar que a inserção do gene anti-senso tem a finalidade de diminuir a expressão sem adição de Tet. Para validação, foi clonado o gene de catalase,

ausente em *L. mexicana*. Os resultados confirmaram que a expressão foi dose e tempo dependente em formas promastigotas, sugerindo que o sistema poderia então ser utilizado para avaliação da biologia, virulência e fisiologia de *L. mexicana* (KRAEVA et al., 2014).

A presente tese utilizou o conhecimento sobre a biologia molecular de *Leishmania*, a necessidade de otimizar e validar os modelos moleculares para a descoberta de novos fármacos e o sistema criado por Kraeva *et al.*, para validar a superexpressão induzida de proteínas endógenas em *L. mexicana*. A cepa co-expressando TetR e T7 polimerase, assim como o vetor utilizado para clonagem do gene de interesse, foi gentilmente cedido pelo grupo ao Prof. Jeremy Mottram. Durante a execução dos experimentos, uma limitação da metodologia foi confirmada, por isso, o objetivo de aperfeiçoar o sistema foi inserido no projeto. A discussão sobre a limitação e os detalhes sobre o método serão destacados na seção 3. Métodos e 4. Resultados e Discussão.

3. MATERIAL E MÉTODOS

Os materiais e as metodologias empregadas neste capítulo serão separados por áreas: bioinformática, cultura de bactérias, técnicas de biologia molecular, técnicas bioquímicas e métodos com cultura de *Leishmania*.

3.1 Bioinformática

3.1.1 Obtenção e manipulação das sequências de DNA

As sequências dos genes utilizados na tese foram obtidas banco de dados TriTrypDB em formato FASTA (<http://tritrypdb.org/tritrypdb>). As sequências foram confirmadas por banco de dados curado do laboratório, a fim de preservar a confiabilidade.

A manipulação *in silício* das sequências de DNA e vetores foram realizadas utilizando CLC *Main Workbench* (CLC Bio). Este software foi utilizado para o desenho de iniciadores, alinhamento de sequências e geração *in silico* dos vetores. Para desenho de iniciadores e geração *in silico* dos plasmídeos gerados por “*Gibson assembly*” foi utilizado a ferramenta *NEBuilder Assembly Tool* (<http://nebuilder.neb.com/>).

3.2 Cultura de bactérias – métodos empregando *E. coli*

Para as transformações após a geração dos plasmídeos, foram utilizadas *E. coli* competentes de alta eficiência, cepa K12 (NEB® *5-alpha Competent E. coli (High Efficiency - C2987)*) obtidas do fornecedor New England Biolabs.

As bactérias foram cultivadas em meio Luria-Bertani (LB) líquido (10 g Peptona 140, 5 g extrato de levedura, 5 g cloreto de sódio para 1 L de água destilada) ou LB ágar (LB líquido adicionado de 12 g ágar para 1 L de água destilada) (BERTANI, 1951).

3.2.1 Transformações

Alíquotas de 50 µL de bactérias competentes foram descongeladas em gelo e em seguida adicionados de 4 µL (~10 ng) de DNA (proveniente das reações de *Gibson Assembly*) e incubadas em gelo por 30 min. Em seguida as células foram submetidas ao choque térmico que consiste em incubação por 45 segundos a 42 °C em banho maria seguido de 2 min em gelo. Bactérias foram cultivadas em duas fases, uma primeira de recuperação onde 950 µl de meio SOC (meio LB modificado para permitir a melhor recuperação das bactérias e eficiência da transformação - 2% triptona, 0,5% extrato de levedura, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl₂, 10 mM MgSO₄ e 20 mM glucose) foi adicionado aos tubos que foram incubados por 1 h a 37°C com agitação a 225 rpm. Em seguida, 60 µl de cada transformação foi adicionado em placas de petri com meio LB ágar com 100 µg/mL de ampicilina (Sigma-Aldrich-Aldrich) e incubadas durante a noite em estufa a 37 °C.

3.2.2 Cultura e armazenamento de bactérias

Após a transformação, colônias individuais foram inoculadas em meio LB líquido com o antibiótico de seleção ampicilina 100 µg/ml (Sigma-Aldrich) e cultivado durante a noite sob agitação a 225 rpm e a 37°C para seleção das bactérias expressando o plasmídeo de interesse. Para armazenamento das cepas de interesse, 0,5 ml de cultura foi misturada com 0,5 mL de com adição de 30 % (v/v) de glicerol e armazenados a -80°C.

3.2.3 Preparação dos plasmídeos de *E. coli*

Os plasmídeos foram purificados de *E. coli* utilizando para extração do DNA o kit *QIAprep Spin Miniprep*[®] kit (Qiagen), de acordo com o protocolo do fabricante para “*QIAprep Spin Miniprep Kit Using a Microcentrifuge*[®]”. Os plasmídeos foram confirmados por endodigestão com enzimas específicas, por PCR utilizando iniciadores para a região codificante inserida, e/ou sequenciamento. A lista dos plasmídeos utilizados e gerados na tese estão listados no quadro abaixo:

Quadro 2 – Tabela com os códigos e descrição dos plasmídeos utilizados e gerados na tese. Os plasmídeos gerados estão descados em negrito. Os antibióticos de resistência descritos na tabela são: Amp: ampicilina; Hyg: Higromicina B; SAT: Nourseotricina; G418: Neomicina; PAC: puromicina

| Código | Vetor | inserto (gene) | Descrição | Inserção | Seleção <i>E. coli</i>/Leishmania |
|---------------------|---------------|----------------------------|--|-----------------------------|--|
| pGL2439 | pVY107 | - | Vetor superexpressão emduzida em <i>L. mexicana</i> (Kraeva, et al., 2014) | B-Tubulina | Amp/Hyg,SAT |
| pGL2471 | pVY107 | CYCA (LmxM.25.1470) | Vetor para superexpressão emduzida de <i>L. mexicana</i> Ciclema A em pGL2439. GFP como gene repórter na regioa C-termemal. | B-Tubulina | Amp/Hyg,SAT, G418 |
| pGL2566 ou pGL 2614 | pVY085 | TetR | Vetor para expressão de repressor de tetracilema em procíclicas de <i>L. mexicana</i> . (Kraeva, et al., 2014) | Subunidade ribossomal (18S) | Amp/Hyg |
| pGL2567 | pVY087 | T7 polimerase | Vetor para expressão T7 polimerase em procíclicas de <i>L. mexicana</i> (Kraeva, et al., 2014) | Subunidade ribossomal (18S) | Amp/SAT |
| pGL2568 | pVY107 | CRK3 (LmxM.36.0550) | Vetor para superexpressão emduzida de <i>L. mexicana</i> CRK3 em pGL2439. GFP como gene repórter na regioa C-termemal. | B-Tubulema | Amp/Hyg,SAT, G418 |
| pGL2636 | pGL472 | TetR | Vetor para expressão de repressor de tetracilema em todos os estágios de <i>L. mexicana</i> (modificado de pGL472) | Subunidade ribossomal (18S) | Amp/Hyg |
| pGL2652 | pGL631 | T7 polimerase | Vetor para expressão T7 polimerase em todos os estágios de <i>L. mexicana</i> (modificado de pGL631) | Subunidade ribossomal (18S) | Amp/PAC |

3.3 Biologia molecular

3.3.1 Extração de DNA

O DNA genômico de *L. mexicana* utilizado para amplificação de genes foi obtido utilizando-se o kit *DNeasy Blood & Tissue (Qiagen)* de acordo com as recomendações do fabricante.

3.3.2 Quantificação e pureza do DNA

A concentração de DNA ($\text{ng} \times \text{mL}^{-1}$) obtida por espectrofotômetro NanoDrop1000 (NanoDrop), com absorção 260 nm (A_{260}). A pureza foi determinada simultaneamente pelos valores da razão de A_{260} a A_{280} (ácidos nucleicos e proteínas, respectivamente).

3.3.3 Sequenciamento de DNA

O sequenciamento de DNA foi realizado utilizando o kit Mix2Seq®.(Eurofins Genomics). As amostras de DNA foram adicionadas aos tubos seguindo as instruções do fabricante e enviados para sequenciamento na Eurofins MWG Operon (i54 Business Park, Valiant Way, Wolverhampton, WV9 5GB) onde utilizaram o sequenciador Applied Biosystems modelo 3730XL DNA. Iniciadores específicos para as regiões clonadas foram adicionados às reações. Os iniciadores utilizados para sequenciamento foram, em sua maioria, os mesmo utilizados para *Gibson Assembly*. Os iniciadores desenhados especificamente para sequenciamento serão descritos na tabela e nos resultados respectivos.

3.3.4 Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Os oligonucleotídeos utilizados foram desenhados no software *CLC Main Workbench* ou *NEBuilder Assembly Tool* (<http://nebuilder.neb.com/>) e sintetizados pela Eurofins MWG Operon (Ebersber, Germany).

Para a obtenção dos genes, confirmação de integração dos plasmídeos ou ampliação do genoma, foram realizadas PCRs seguindo o protocolo “*PCR with Q5® Polymerase (M0491)*” de New England Biolabs (<https://www.neb.com/protocols>). Brevemente, para 25 µL de reação: amostra de DNA (1ng a 1µg de DNA genômico, 1 pg a 1ng de plasmídeo, ou 1 colônia de bactéria), 5 µL de tampão de reação 5X Q5, 10 µM de cada iniciador (1,25 µL), 0,25 µL (~1µg) de DNA polimerase Q5 High-Fidelity, 5 µL de intensificador 5X Q5 *High GC Enhancer* e água deionizada para completar o volume de 25 µl. Termociclos foram programados como descrito na tabela 2. Quando necessário, os produtos da PCR foram purificados usando o kit de purificação *QIAquick PCR Purification* (Qiagen).

Tabela 7 - Condições das reações de cadeia da polimerase utilizadas.

| Etapa | Temperatura (°C) | Tempo |
|--------------------------|---------------------------|-------------------------|
| Início desnaturação | 98 | 3 min |
| Desnaturação (35 ciclos) | 98 | 30 sec |
| Anelamento (35 ciclos) | Específica cada iniciador | 60 sec |
| Extensão (35 ciclos) | 72 | Variável (30 s por 1kb) |
| Extensão final | 72 | 5 min |
| Hold | 4 | Hold |

3.3.5 Enzimas de restrição

Todas as endonucleases de restrição utilizadas foram obtidas da England Biolabs (NEB) e utilizadas de acordo com as instruções do fornecedor. Para digestões duplas, as condições ótimas de reação foram obtidas pelo *Digest Finder tool* (<https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/double-digest-finder>). Para digestões de plasmídeos ou para gerar fragmentos para clonagem, as digestões foram realizadas por pelo menos 20 minutos em temperatura ótima da enzima (geralmente 37 °C). Para linearização de plasmídeos usados em transfecções (~10 µg de DNA), a digestão foi realizada *overnight* com volume final

de 100 µL. As digestões foram realizadas com quantidades de DNA e enzima como especificado pelo fabricante (New England Biolabs©). Quando utilizadas duas enzimas de restrição, as digestões seguiram as especificações sugeridas em <https://www.neb.com/tools-and-resources/interactive-tools/double-digest-finder>. Todas as digestões foram confirmadas pelos fragmentos de tamanhos esperados em gel de agarose 0,8% em tampão TBE 0,5% (20mM Tris, 20 mM ácido bórico, 0,5 mM EDTA, pH 7.2).

3.3.6 Eletroforese em gel de agarose

Os fragmentos de DNA utilizadas foram analisados por eletroforese em gel de agarose. Este método também foi utilizado para purificação dos fragmentos de DNA baseado nos tamanhos esperados. Para tal, agarose UltraPure (Invitrogen) foi dissolvida em tampão TBE 0,5x (20mM Tris, 20 mM ácido bórico, 0,5 mM EDTA, pH 7.2) a 0,8% m/v. Após solubilização, foi adicionado o marcador de DNA SYBR-safe (Invitrogen) para visualização dos fragmentos. As amostras de DNA foram preparadas com a adição do tampão de corrida *Loading Buffer* 6x (0,25 % (m/v) azul de bromofenol, 0,25 % (w/v) cianol de xileno FF, 30 % (v/v) glicerol, em H₂O) e aplicados nos poços. A separação foi realizada em 110 V por ~50 min e as imagens adquiridas com *Thermo Scientific myECL Imager*.

Quando necessário, as purificações dos fragmentos de DNA foram realizadas com a visualização do gel em transiluminador UV em câmara escura e os fragmentos excisados utilizando lâmina de bisturi. Os fragmentos de DNA foram extraídos do gel de agarose com kit *Gel Extraction* (Qiagen).

3.6.7 Recombinação de DNA - Geração dos plasmídeos

Todos os plasmídeos gerados foram montados utilizando o protocolo do kit de *Gibson Assembly* (New England Biolabs©).

A metodologia foi desenvolvida por Gibson e colaboradores, e permite a montagem de múltiplos fragmentos de DNA independentemente do tamanho e compatibilidade. Tem sido extensivamente utilizada, visto que é um método rápido, fácil, flexível e pode ser usado para gerar vetores grandes (GIBSON et al., 2009).

Os fragmentos de PCR e os vetores lineares contendo finais que se sobrepõem são facilmente montados em plasmídeos por recombinação homóloga em *E. coli*.

A reação de clonagem foi realizada em um único tubo em uma reação isotermal. O kit utilizado contém 3 diferentes enzimas e um tampão. O método está esquematizado na figura abaixo:

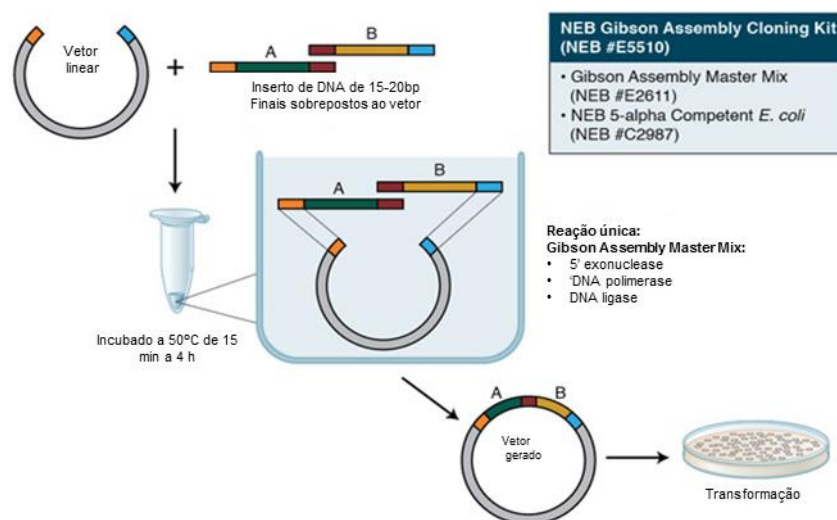


Figura 33: Desenho esquemático do processo de clonagem utilizado. Modificado de: <https://www.neb.com/applications/cloning-and-synthetic-biology/dna-assembly-and-cloning/gibson-assembly#tabselect2>

Os genes foram obtidos e amplificados como descrito nas seções anteriores. Os iniciadores desenhados por *NEBuilder Assembly Tool* (<http://nebuilder.neb.com>) foram sintetizados por *Eurofins genomics* e contém sobreposição ao vetor linear de 30 nucleotídeos. Foi definido o tamanho da sobreposição baseado no fato de que o tamanho desta aumenta a eficiência da clonagem (JACOBUS; GROSS, 2015). Os fragmentos (insertos) amplificados por PCR e o vetor de clonagem linearizados e purificados (seções 3.3.4, 3.3.5 e 3.3.6) foram incubados com *MasterMix* do kit. Foi utilizada a proporção otimizada para maior eficiência da clonagem: 50–100 ng do vetor com 2–3 vezes do inserto. Todos os plasmídeos foram gerados com apenas 2 fragmentos. As condições da clonagem estão na tabela 2.

Tabela 8 - Condições reações de clonagem utilizadas.

| Clonagem 2-3 Fragmentos | |
|--------------------------------|---------------------|
| Razão de DNA | vetor:inserto = 1:3 |
| Assembly Master Mix (2X) | 10 µl |
| H ₂ O deionizada | 10-X µl |
| Volume Total | 20 µl |

A reação foi incubada por 4 h a 50 °C e o plasmídeo gerado armazenado em freezer -20 °C ou transformado em *E. coli*, como descrito em 3.2.1. Os iniciadores utilizados estão no quadro 2 e os vetores finais em resultados.

Quadro 3 - Sequência e código dos iniciadores utilizados para geração dos plasmídeos e sequenciamento.

| Oligo | Sequência | Descrição |
|--------------|---|--|
| 5670 | ctcgcgtgtgttgagccgtccaccgtagccATGTCTAG ATTAGATAAAAGTAAAGTG | <i>Forward</i> Gibson assembly TetR em pRIB |
| 5671 | cggtgagttcaggcttttcatcactagtgACTTTCACAT TTAAGTTGTTTTTC | <i>Reverse</i> Gibson assembly TetR em pRIB |
| 5672 | ctcgcgtgtgttgagccgtccaccgtagccATGGAGAC GATTAACATCGC | <i>Forward</i> Gibson assembly T7 em pRIB |
| 5673 | tgctcttgcttaaggcgcgcccggccgcaCTACGCG AACGCGAAGTC | <i>Reverse</i> Gibson assembly T7 em pRIB |
| 5701 | agctcctcgccctgtctcacCCAACGAAGGTCGCT GAAC | <i>Forward</i> Gibson assembly Crk3 em pVY107 (eGFP C-term) |
| 5702 | ctacacacctccacagcagccatggATGTCTTCGTT TGGCCGTG | <i>Reverse</i> Gibson assembly Crk3 em pVY107 (eGFP C-term) |
| 4919 | ccacagcagccATGGCGGTTCCACTGCGA | <i>Reverse</i> Gibson assembly CYCA em pVY107 (eGFP C-term) |
| 4918 | cttgctcaccatggcCGCAGAAGTTGAAATGAA AGG | <i>Forward</i> Gibson assembly CYCA em pVY107 (eGFP C-term) |
| 2380 | CATTCCGTGCGAAAGCCGG | Confirmar integração do plasmídeo pRIB |

3.6.8 Precipitação do DNA

O DNA para transfecção em *L. mexicana* foi concentrado em uma solução de etanol 100% com adição de 10% do volume final de acetato de sódio (3 M, pH 5,2). As amostras foram mantidas por uma noite em -20 °C e em seguida centrifugadas a 13,000 x g por 30 minutos a 4 °C. O DNA precipitado foi lavado com 700 µl de etanol 70% e centrifugado novamente nas mesmas condições. O sobrenadante foi removido e o DNA precipitado foi seco em fluxo laminar. O DNA foi então ressuspendido em água ou tampão de eluição estéril.

3.7 Métodos Cultura de *Leishmania mexicana*

3.7.1 Cultura de formas promastigotas de *Leishmania mexicana*

As cepas de *Leishmania mexicana* (MNYC/BZ/62/M379) selvagem e transgênica T7TR (KRAEVA et al., 2014), e derivados foram cultivadas em meio Eagle modificado (HOMEM, do inglês *Haemoflagellate minimal essential medium*) suplementado com 10 % (v/v) de soro fetal bovino inativado (SFB) e 1 % (v/v) de solução penicilina/estreptomicina (Sigma-Aldrich) em estufa a 25°C. As cepas transgênicas foram mantidas nos antibióticos de seleção apropriados: G418 (Neomicina) a 10 µg/ml; Higromicina a 50 µg/ml; SAT: Nourseotricina a 50 µg/ml; Puromicina a 75 µg/ml (InvivoGen).

3.7.2 Cultura de formas amastigotas axênicas de *L. mexicana*

L. mexicana amastigotas foram obtidas a partir de cultura em fase logarítmica tardia de promastigotas. Para tal, 1×10^6 /ml parasitos foram inoculados em meio Schneider modificado (*Schneider's Drosophila* com 2.5mg/mL de Hemina) com 20% de soro fetal bovino, pH 5,5 e mantidos em estufa a 35 °C e 5% de CO₂. Após aproximadamente 120 horas os parasitos terminam o processo de diferenciação em amastigotas axênicas e foram utilizados para os experimentos.

3.7.3 Determinação da densidade celular

A cultura de promastigotas de *L. mexicana* foram homogeneizados gentilmente por pipetagem e 50 µL dos parasitos foram adicionados em 50 µL de formaldeído 3%. 10 µl da mistura foi aplicada em câmara de Neubauer (Weber Scientific) e os parasitos contados em microscópio óptico. Para curva de crescimento, o inoculo inicial de parasitos foi de 1×10^6 células/mL e a densidade determinada diariamente por 7 dias.

Para contagem de amastigotas axênicas, a cultura foi centrifugada e o precipitado ressuspenso em 1 mL de meio. Em seguida foi utilizado agulha calibre 26 para separação dos *clusters*. Foram realizadas diluições para contagem em câmara de Neubauer (Weber Scientific) em microscópio óptico de fase.

3.7.4 Armazenamento de *Leishmania*

Para armazenamento por longo prazo e manutenção das cepas geradas 500 µl da cultura de parasitos foi adicionado a 500 µL de meio de congelamento: HOMEM + 20% SFB (soro fetal bovino) + 10% DMSO em criotubos de 1,5 mL. Os tubos foram catalogados, armazenados por 24 h em -80°C e depois transferidos para tanque de nitrogênio líquido.

3.7.5 Transfecção e seleção dos clones

As transfecções de *L. mexicana* foram realizadas utilizando o kit *Amaza human T cell nucleofector* (Lonza) de acordo com as instruções do fabricante. Para cada gene transfectado, 5×10^7 parasitos em fase logarítmica foram centrifugados 1000 g por 10 min em centrífuga refrigerada a 4°C, ressuspenso em 100 µl da solução *T cell nucleofector* e transferidos para uma cubeta. Aproximadamente 10 µg de DNA em 10 µl de solução tampão foi adicionado à cubeta com os parasitos. As células foram eletroporadas utilizando o programa U-033 e então transferidas para frascos com 10 mL de meio HOMEM + 20 % SFB. A cultura foi dividida em 2 frascos a fim de selecionar eventos independentes de transfecção e incubadas durante a noite a 25°C para recuperação. Para cada transfecção foi realizado

controle negativo com 10 µl de dH₂O. No dia seguinte, foi adicionado antibióticos para seleção dos transfectados. Parasitos transfectados foram submetidas a diluição seriada em HOMEM + 20% SFB + antibióticos e adicionadas em microplacas de 96 poços. As placas foram mantidas a 25°C por 2-4 semanas até a visualização de clones.

3.7.6 Indução com tetraciclina

A expressão induzida dos genes em linhagens de *L. mexicana* T7TR após seleção e confirmação dos clones foi realizada por adição de 1 a 10 µg/mL de tetraciclina (SIGMA-ALDRICH) por 48 h.

3.7.7 Análise do ciclo celular por quantificação de DNA em citometria de fluxo

Para determinar o conteúdo do DNA dos parasitos após indução por citometria de fluxo, os parasitos foram centrifugados após indução, fixados em metanol 70% em PBS 30% durante a noite a 4°C. Após a fixação, as células foram lavadas em PBS e ressuspendidas em PBS + 10 µg/ml de iodeto de propídeo (IP), 10 µg/ml RNase A a 37°C por 45 min. Os eventos foram lidos em Citômetro de fluxo Beckman Coulter CyAn ADP, (655-750nm) para detecção de PI. A análise dos dados foi usando o software FlowJo (Tree Star Inc.).

3.8 Métodos bioquímicos

3.8.1 Obtenção dos extratos proteicos

Promastigotas ou amastigotas axênicas de *L. mexicana* foram centrifugados a 1.200 g por 10 min, lavados em PBS e lisados utilizando tampão de lise: 897 mL de CHAPS (detergente), 1 µL Pepstatina, 100 µL de 10x *Protease inhibitor* (Ultra-ROCHE), 1 µL de DTT 1M, 1 µL de PMSF 1M. As amostras foram mantidas na solução de lise por 24 h e a concentração de proteína quantificada por Bradford (BRADFORD, 1976). Trinta microgramas de proteína foram incubados com tampão

de amostra (2x SB *NuPAGE solution* (Novex)) com 1mM β -mercaptoetanol por 10 min a 100°C antes de serem aplicadas no gel de poliacrilamida 10 % (SDS-PAGE) pré-montado (Novex).

3.8.2 SDS-PAGE

Eletroforese em gel de SDS-poliacrilamida (SDS-PAGE) foi utilizado para separação das proteínas de acordo com o tamanho. Os géis utilizados foram *NuPAGE™ Novex™ 10% Bis-Tris Protein Gels*, 1.0 mm, 12-well (Invitrogen) em cuba *XCell SureLock™ Mini-Cell Electrophoresis System* (Invitrogen). *NuPAGE® MES SDS Running Buffer* (Invitrogen) foi usado como tampão de corrida. A amostras obtidas como descrito acima, foram aplicadas no gel na concentração de 30 μ g de proteína. A eletroforese foi por aproximadamente 45 min a 150V.

3.8.3 Western blotting

Para *Western blotting*, as proteínas foram transferidas do gel de SDS-poliacrilanda após eletroforese para uma membrana de nitrocelulose (Hybond-C, Amersham, GE Healthcare) por 2 horas a 4°C. A eficiência da transferência foi verificada por coloração da membrana com solução de Ponceau S (0,1% de *Ponceau S* em 5% de ácido acético). As membranas foram bloqueadas por 1 h, à temperatura ambiente com TBS-T (20 mM de Tris, 200 mM de NaCl e 0,1% de Tween-20), com 5% de leite em pó (Sigma-Aldrich). Após o bloqueio, as membranas foram incubadas com anticorpo desejado diluídos em TBS-T com 5% de leite à temperatura ambiente por 1 h ou *overnight*, dependendo do anticorpo, sob agitação. Em seguida, as membranas foram lavadas três vezes com TBS-T e incubadas com o anticorpo secundário específico para cada anticorpo primário em TBS-T com 5% de leite por 1 h, à temperatura ambiente. Após, as membranas foram novamente lavadas 3 vezes com TBS-T e reveladas com kit ECL (*Enhanced chemiluminescence, SuperSignal West Pico Chemoluminescent Substrate, Pierce*) seguindo os protocolos do fabricante e visualizados com *Thermo Scientific myECL Imager*. Os anticorpos utilizados e as concentrações estão descritos no quadro abaixo.

Quadro 4 - Lista de anticorpos utilizados para Western blot.

| Anticorpo primário | Condições | Anticorpo secundário |
|--|--|--|
| Anti-GFP (ABCAM) | 1:1000 por 12 horas a 4°C | Anti-IgG HRP-conjugado <i>Anti-mouse</i> – 1:5000 |
| Anti-EF1- α (Milipore) | 1:10000 por 1 hora temperatura ambiente | Anti-IgG HRP-conjugado <i>Anti-mouse</i> – 1:5000 |
| Anti-OPB serum (Prof. Mottram) | 1:20000 por 1 hora temperatura ambiente | Anti-IgG HRP-conjugado – <i>anti-Rabbit</i> - 1:10000 |
| Anti-Repressor deTetracilcina (Sigma) | 1:1000 por 1 hora temperatura ambiente | Anti-IgG HRP-conjugado <i>Anti-mouse</i> – 1:5000 |

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Superexpressão de proteína quinase dependente de ciclina 3 (CRK3) em promastigotas

Como revisto no referencial teórico, a proteína quinase CRK3 é essencial para crescimento de promastigotas de *L. mexicana* e o complexo CRK3/CycA pode ser inibido por pequenas moléculas (HASSAN et al., 2001; WALKER et al., 2011). Além disso, a deleção de *CRK3* de *L. mexicana* atenua a infecção em camundongos, indicando que a proteína quinase é essencial para replicação de amastigotas (DUNCAN et al., 2016). Em conjunto, esses dados indicam *CRK3* como potencial alvo terapêutico para tratamento de infecções causadas por *L. mexicana*.

Foi demonstrado no capítulo anterior que o alcaloide 3-metoxi-2-oxa-4,10b-diaza-1,3,6a,10c-tetrahidrofluoranthano-3,5-diol induz alterações morfológicas em *L. amazonensis* indicando bloqueio na citocinese, impedindo a divisão celular. Este mesmo fenótipo (multinucleadas, vários flagelos e bloqueio na citocinese) foi observado por outros autores quando promastigotas de *L. mexicana* foram tratadas com o alcaloide da classe indirubina (Grant et al. 2004), quando o gene *CRK3* é nocauteado (DUNCAN et al., 2016) ou quando utiliza-se inibidor específico para proteínas quinases (HASSAN et al., 2001). Relacionando o fenótipo observado em *L. amazonensis* e os dados disponíveis sobre a função de *CRK3* em *L. mexicana*, esta quinase foi escolhida para gerar o sistema de superexpressão induzida por tetraciclina. Sendo assim, foi gerada, durante o período de doutorado sanduíche, uma linhagem de *L. mexicana* superexpressando *CRK3* após indução com tetraciclina.

A cepa de *L. mexicana* (T7TR) utilizada para transfecção, co-expressa o repressor de tetraciclina e T7 polimerase e foi doada pelo grupo que gerou o modelo e os plasmídeos para superexpressão induzida por tetraciclina, coordenado pelo Professor Vyacheslav Yurchenko. O plasmídeo utilizado para clonar o gene de interesse tem as regiões promotoras para expressão induzida por tetraciclina, como descrito por Kraeva e colaboradores (2014) e explicado no referencial teórico da tese.

Utilizando a metodologia de montagem de plasmídeo descrita por Gibson e colaboradores (2009), o gene complementar reverso, sem stop códon, (LmxM.36.0550 - CRK3) foi clonado no vetor, pVY107 (Figura 8), após linearização do plasmídeo com NcoI (KRAEVA et al., 2014).

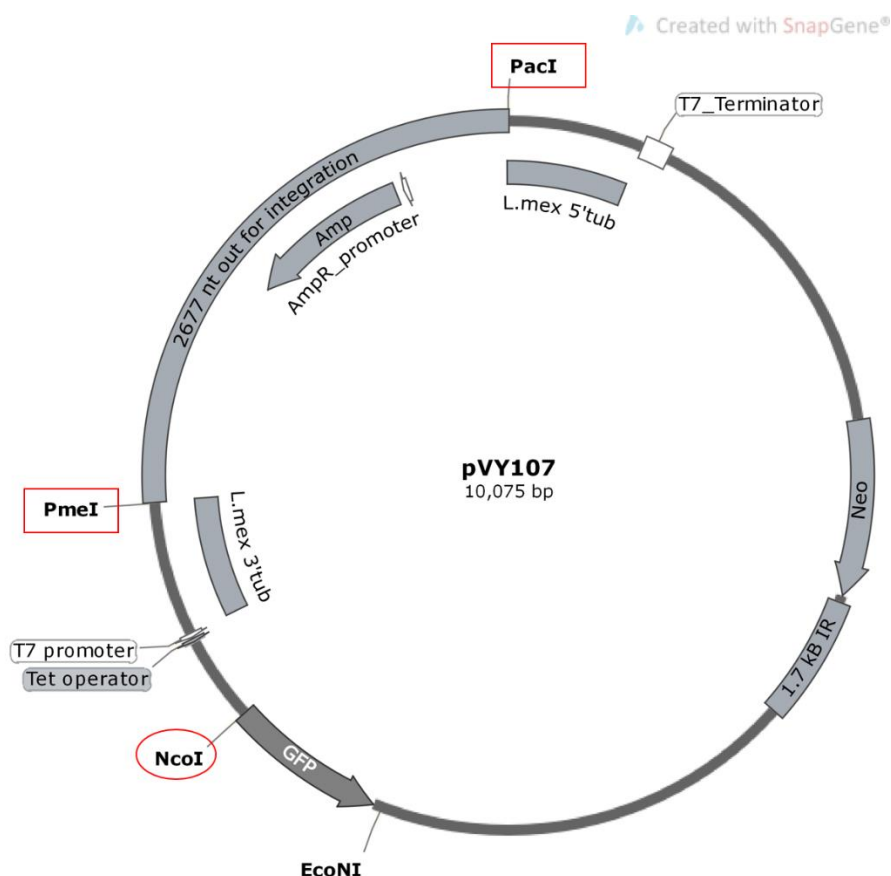


Figura 34– Representação do plasmídeo pVY107 utilizado para inserção dos genes de interesse na cepa de *L. mexicana* T7TR. O plasmídeo doado por Kraeva e colaboradores (2014) tem ~10 kb. As enzimas de restrição utilizadas no processo de clonagem e transfeção estão destacadas: NcoI (círculo vermelho) foi utilizada no sítio de clivagem para inserção de CRK3 com GFP na região C-terminal. Já as enzimas PmeI e PacI (retângulos) são utilizadas para linearização do vetor para transfeção em *L. mexicana*. Plasmídeo gerado *in silico* com *NEBuilder Assembly Tool* (<http://nebuilder.neb.com/>) e vetor esquemático para figura com SnapGene® versão 3.3.1.

Bactérias competentes *E. coli* foram transformadas com plasmídeo resultante. No dia seguinte, colônias de bactérias foram observadas nas placas. Foi extraído o DNA de uma colônia e enviado para sequenciamento para confirmar a presença do gene. Tanto o plasmídeo gerado quanto as bactérias estão armazenados e disponíveis para utilização. O resultado foi alinhado com a sequência de *CRK3* (LmxM.36.0550) anotada no banco de dados, confirmando a

correta clonagem (Figura 9). Na figura 10, observa-se o plasmídeo resultante após a clonagem do gene. Foi demonstrado por outros autores que CRK3 expressa fusionada com o gene repórter na região C-terminal é enzimaticamente funcional (HASSAN et al., 2001; GRANT et al., 2004; GOMES et al., 2010), assim o gene de GFP fusionado à porção C-terminal foi utilizado para análise da expressão por *immunoblotting*, visto a ausência de anticorpo anti-CRK3. Ainda, o vetor contém um gene codificante para resistência a neomicina (G418), permitindo selecionar os parasitos com o plasmídeo integrado após a transfecção.

Leishmania mexicana MHOM/GT/2001/U1103 cdc2-related kinase partial mRNA
 Sequence ID: [XM_003874350.1](#) Length: 936 Number of Matches: 1

Range 1: 160 to 929 [GenBank](#) [Oribiaca](#) [▼ Next Match](#) [▲ Previous Match](#)

| Score | Expect | Identities | Gaps | Strand |
|---------------|---|--------------|------------|------------|
| 992 bits(537) | 0.0 | 705/781(90%) | 32/781(4%) | Plus/Minus |
| Query 368 | CGAAGGTCTCTGAACCACGGGTGCTGTAAGGCTCCTTGCTGATATGCTCTCCCGTGA | 427 | | |
| Sbjct 929 | CGAAGGTGCTGAAACCACGGGTGCTGTAAGGCTCCTTGCTGATATGCTCTCCCGTGA | 870 | | |
| Query 428 | TCGTACTTGACCATCTGGAGAGAAGATCATTAGCGTCTGGATGAATTCGGTACTACC | 487 | | |
| Sbjct 869 | TCGTACTTGACCATCTGGAGAGAAGATCAATAGCGTCTGGATGAATTCGGTACTACC | 810 | | |
| Query 488 | TGCCCCCTTCGCTTTGCGGTCCACTTGGGAAATACGTCGCGTAATCAGGAAGCCGCGAC | 547 | | |
| Sbjct 809 | TGCCCCAGCCCTTCGCGGTCCACTTGGGAAATACGTCGCGTAATCAGGAAGCCGCGAC | 750 | | |
| Query 548 | TCACCAAGGCCAGGACCCCTCTGTGTCGGTCGGAGTCCCAACACTTGATAAATCTCAAAC | 607 | | |
| Sbjct 749 | ACACCAAGGCCAGGACCCCTCGGTGTCGGTCGGAGTCCCAACACTTGATAAATCTCAAAC | 690 | | |
| Query 608 | AACTGCCCGATTTCGCTATCGCCGCGGAAAAGAACCTTTTCGGCGTGTAGCTCGCGAAA | 667 | | |
| Sbjct 689 | AACTGCCCGATTTCGCTATCGCCGCGGAAAAGAACCTTTTCGGCGTGTAGCTCGCGAAA | 630 | | |
| Query 668 | ATGCAGCCGACACTCCACATATCCCTCAGCATGATTGTAGTCTTCTCACCAGSAGGATC | 727 | | |
| Sbjct 629 | ATGCAGCCGACACTCCACATATCCACAGCAGGATGTAGTCTTCTCACCAGSAGGATC | 570 | | |
| Query 728 | TCAGGGGCACGGTATCACAGTCGTAACCCTCGTGCSTGTAGGTGTGCATGGGCACCTG | 787 | | |
| Sbjct 569 | TCAGGGGCACGGTATCACAG-CGTAACCCTCGTGCSTGTAGGTGTGCATGGGCACCTG | 511 | | |
| Query 788 | AAACGCTCGGGTGACACCGAAATCATCAATTTAAG-ACGTTCCCTGATGTCCAGGATGGA | 846 | | |
| Sbjct 510 | AAACGCAAGGGCGAGACCGAAATCAGCAATTTAAGGACGTTCCCTGATGTCCAGGA-GGA | 452 | | |
| Query 847 | TGATGGCTGGCT-CATATCACGGTGGAAATGATGACGATGGCGGTGAAATACAGTAAAGGA | 905 | | |
| Sbjct 451 | TGTTGGCTGGCTTCAATCACGGTGGAAATGATGATG-CGATGGCGGTGGCAAA-AGTAAAGGC | 395 | | |
| Query 906 | CGCTAAAAGCTGATAAATAAGCCGCTGCGATCCATTCCAGAAATAGCGGCCG-CTTG | 964 | | |
| Sbjct 394 | CGCTAAAAGCTGATAAATAAGCCGCTT-CAGATCCATTCCAGA-GTAGCCGCCCTCTTG | 337 | | |
| Query 965 | CTTT-CAATCGC-TTTT-CAAGGACGCTT-CACATAATCGAAAAATGTAAGCTTCCC | 1020 | | |
| Sbjct 336 | CTTTTCAATCGCTTTTTCAGGTCCGCTCCACATACTCGAAGACAAGGTAGAGCTTCCC | 277 | | |
| Query 1021 | GTC-GAACAA-TGACATCA-GCAAAT-CAC-ATGTTGGGCTAGTACCAGAACTTTGC-GA | 1074 | | |
| Sbjct 276 | GTCCGACAAATGACATCAAGCAAATTCACAAATGTTGGGTTGGT-C-GAACTCTTGACA | 219 | | |
| Query 1075 | AT-GA-ACCTCGCGAAG-GC-GACTGCG-AA-ACC-TCGTAAGTGGCAATCG-GTCGCA | 1126 | | |
| Sbjct 218 | ATTGACACCTCGCGCAGCGCAGTCTGCGAATACCCTC-CTCAGTGCGA-TCGAGTCGCA | 161 | | |
| Query 1127 | C 1127 | | | |
| Sbjct 160 | C 160 | | | |

Figura 35– Resultado do BLAST da sequência obtida por sequenciamento da colônia com o gene anotado de CRK3. A sequência do gene foi obtida pelo banco de dados TrytripDB e o alinhamento realizado pelo BLAST (Standard Nucleotide BLAST).

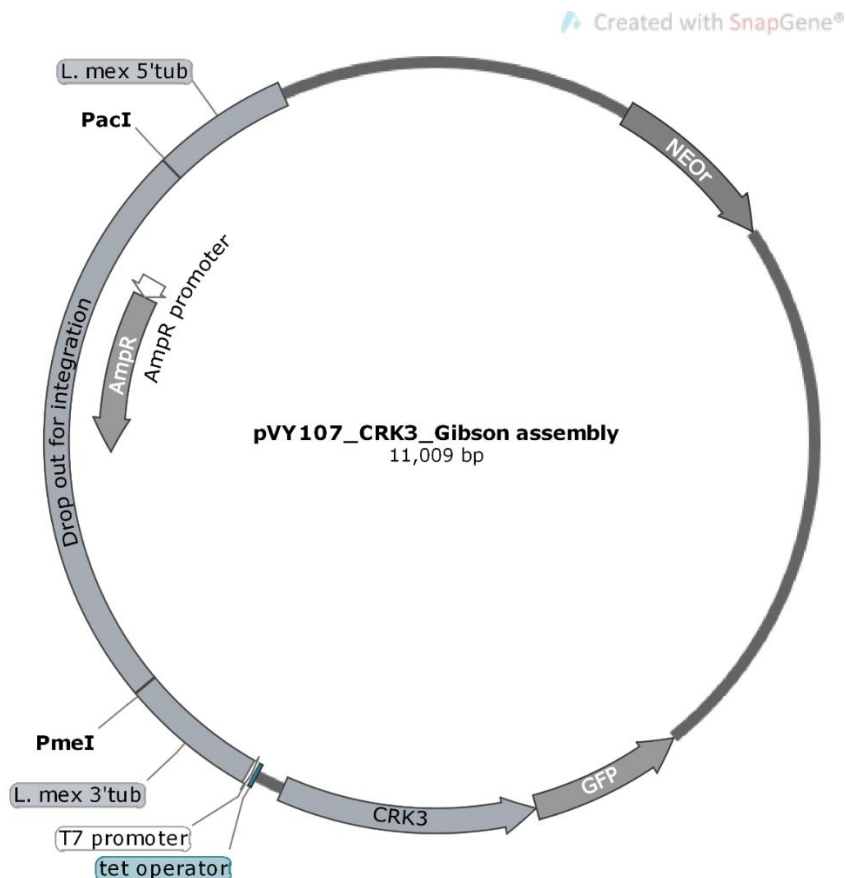


Figura 36 - Representação do plasmídeo pVY107_CRK3 após clonagem do gene CRK3. A enzimas de restrição PmeI e PacI utilizadas para linearização do vetor para transfecção em *L. mexicana*. As características do vetor estão destacadas, como a região eliminada após digestão com PacI/PmeI (*drop out for integration*); o promotor da resistência bacteriana (*Amp promoter*); região de ligação no gene de tubulina (5' *tubulin* e 3' *tubulin*); gene de resistência à neomicina (NEOr). Além dos operadores e promotores necessários para expressão de CRK3 fusionado à GFP em sentido antisenso. pb: pares de bases; IR: região intergênica. Plasmídeo gerado *in silico* com *NEBuilder Assembly Tool* (<http://nebuilder.neb.com/>) e vetor esquemático para figura com SnapGene® versão 3.3.1.

Os plasmídeos foram extraídos, linearizados (PacI/PmeI) e transfectados em formas infectivas (baixo número de passagens) da linhagem de *L. mexicana* expressando os genes de T7 polimerase e repressor de tetraciclina. Após a transfecção, o vetor se integra com orientação anti-senso no *locus* de β -tubulina. O modelo esquemático do vetor após integração no *locus* pode ser observado na figura 11.

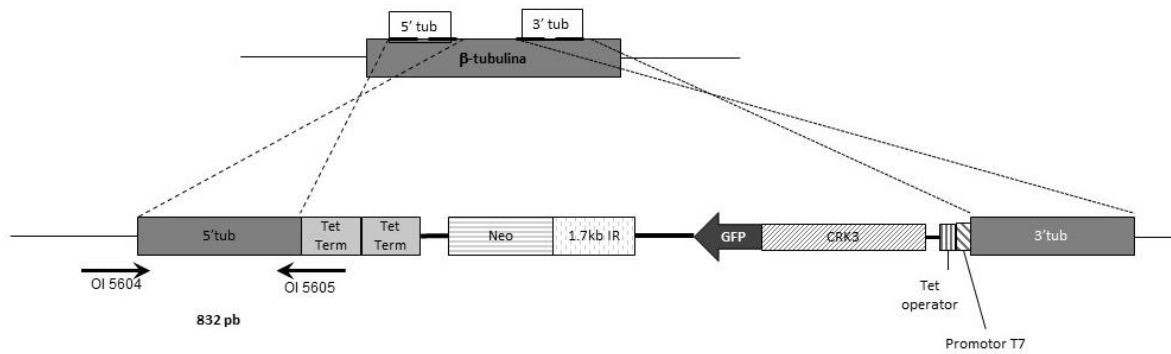


Figura 37 - Representação esquemática da integração do plasmídeo no *locus* β -tubulina em *L. mexicana*. As setas indicam os iniciadores utilizados para verificação da integração após a transfecção. Observa-se o gene *CRK3* fusionado ao gene repórter, GFP. Ambos os genes estão regulados pelo promotor de T7 polimerase e operador de tetraciclina. pb: pares de bases; IR: região intergênica.

Após 3 semanas da transfecção um clone foi obtido. O DNA genômico foi extraído e a amplificação por PCR da região de integração do plasmídeo foi realizada com o par de oligonucleotídeos demonstrado na figura 11. Estes iniciadores foram desenhados a fim de serem utilizados para analisar todas as integrações, visto que se liga nas regiões não variáveis do plasmídeo e no *locus* de tubulina no protozoário. Por este método foi possível demonstrar a correta integração do plasmídeo no *locus* de tubulina, visto que o fragmento esperado de ~832 pares de base foi observado no gel de agarose após a PCR (Fig. 12). A linhagem obtida será denominada no texto a partir de agora como LmCRK3::GFP.

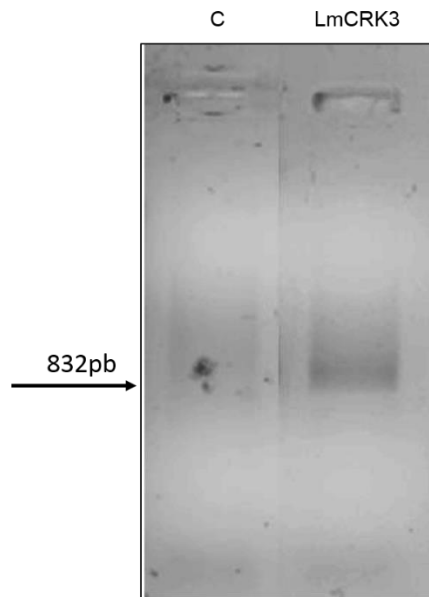


Figura 38 – Perfil eletroforético em gel de agarose do produto da PCR após amplificação com os iniciadores OL5604 e OL5605. O DNA genômico da cepa controle (selvagem, não transfectada) e da cepa LmCRK3::GFP foi extraído e submetidos à amplificação. O fragmento esperado de 832 pb pode ser observado somente na cepa transfectada.

Após a confirmação da integração do vetor na região genômica de interesse, foi verificada a expressão de CRK3 fusionada ao GFP por *Western blot* (Fig.13). Para tal, a cepa selvagem e o clone LmCRK3::GFP foram ou não incubados com 10 µg/mL de tetraciclina por 48 h. Após a indução, as amostras foram preparadas para *Western blot*. A quinase CRK3 tem peso molecular de aproximadamente 35kDa e, quando a proteína fusionada ao GFP, ~60kDa. Pode-se notar após a incubação com o anticorpo a banda esperada com peso molecular referente à proteína fusionada ao GFP. Ainda, após a indução por Tet, há aumento na expressão de da proteína CRK3.

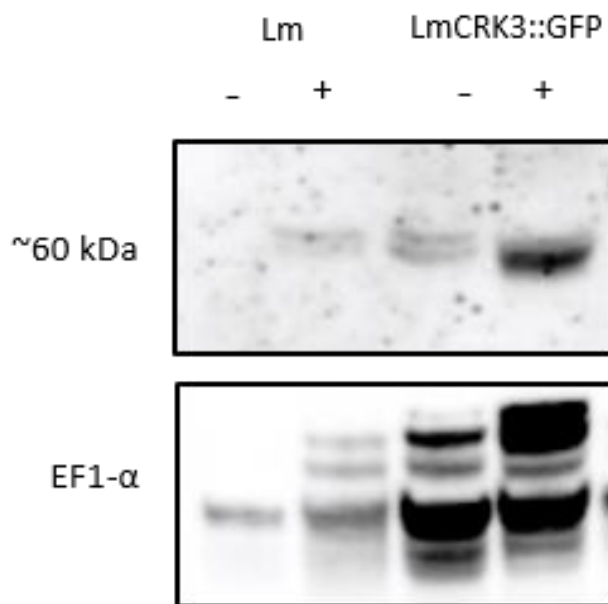


Figura 39 - Western blot demonstrando a superexpressão induzida de CRK3 em *L. mexicana* após cultivo com tetraciclina. Anticorpo Anti-GFP diluído 1:1000 (Abcam, Anti-GFP antibody - ChIP Grade (ab290)) seguido de anticorpo secundário Anti-IgG HRP-conjugated raised in rabbit (1:5000) foi utilizado para identificar a expressão da proteína. Anticorpo Anti-EF1- α (1:10000) foi usado como controle. Lm: controle, cepa T7TR sem o plasmídeo com CRK3; LmCRK3::GFP: cepa transfectada com o plasmídeo. (-): sem tetraciclina; (+): com tetraciclina.

Até o momento, esta foi a primeira vez que foi demonstrado que é possível controlar a expressão de proteína endógena em *L. mexicana*. Os trabalhos publicados sobre indução de expressão utilizaram genes repórteres ou proteínas que não são encontradas na espécie para verificar e validar o sistema de superexpressão (YAN; MYLER; STUART, 2001; BREITLING et al., 2002; KRAEVA et al., 2014). A CRK3 é essencial para sobrevivência de *L. mexicana* e o único sistema, até o momento, existente para investigar a função da quinase é a deleção condicional do gene (DUNCAN et al., 2016). A demonstração da possibilidade de induzir a expressão desta quinase também pode ser uma outra ferramenta para avaliar a função de CRK3 no ciclo celular de *Leishmania* (GRANT et al., 1998; HASSAN et al., 2001; GOMES et al., 2010; DUNCAN et al., 2016).

Sabendo que CRK3 tem papel fundamental na progressão do ciclo celular, foi verificado, por citometria de fluxo, o perfil do conteúdo de DNA durante as diferentes fases (Figura 14). A cepa mutada e a selvagem foram induzidas com Tet, por 48 h e incubados com iodeto de propídeo (IP). O IP se intercala no DNA,

permitindo a visualização através da fluorescência. A quantidade de DNA se altera durante as fases do ciclo celular, assim pode-se avaliar as fases do ciclo em relação a fluorescência de IP.

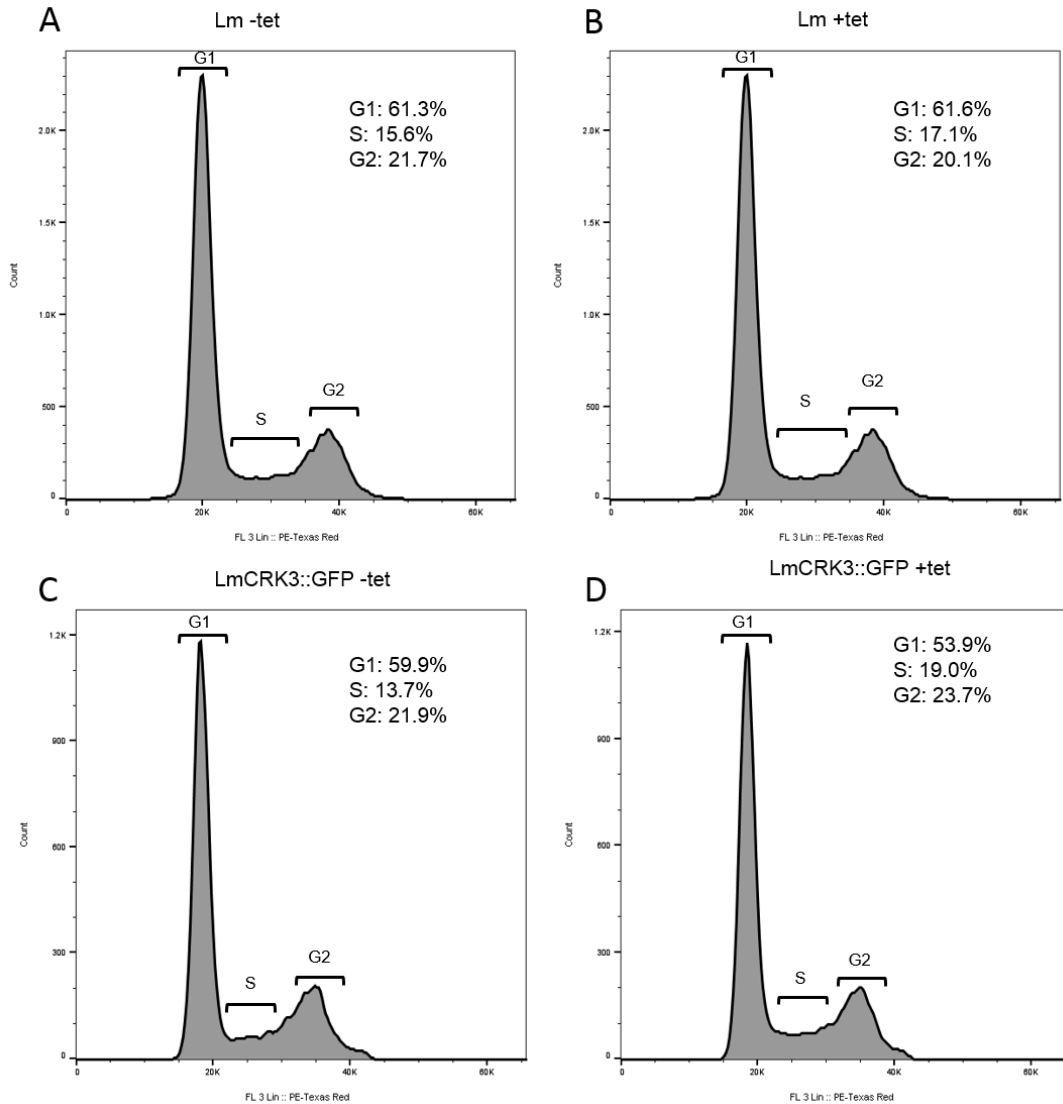


Figura 40– Análise do conteúdo de DNA e perfil do ciclo celular após indução da cepa LmCRK3::GFP e Lm por citometria de fluxo. As cepas foram induzidas por 48 h com 10µg/mL de tet (+Tet) e comparadas com populações não induzidas (-Tet). Os números indicam a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular. A porcentagem de parasitos em cada fase do ciclo foi calculada com o software FlowJo®

Como pode ser observado na Figura 14, o perfil do ciclo celular não foi alterado pela superexpressão e nem pela adição de tetraciclina em ambas as cepas. Sabendo que o equilíbrio de quinases e demais moléculas envolvidas no ciclo celular é importante para correta progressão em diferentes tipos de

organismos (DORÉE; HUNT, 2002; MORGAN, 2007; HARASHIMA; DISSMEYER; SCHNITTGER, 2013), a deleção condicional de CRK3 altera o crescimento de promastigotas e atua durante a transição das fases G2/M (DUNCAN et al., 2016), inicialmente, esperava-se que o aumento de CRK3 induziria alguma alteração no crescimento do parasito.

Foi demonstrado para células de mamíferos e outros organismos, que a atividade das CDKs é altamente regulada por mecanismos como fosforilação e ligação à ciclinas (MALUMBRES; BARBACID, 2005; HYDBRING; MALUMBRES; SICINSKI, 2016). A proteína ciclina A de *L. mexicana* (*CycA*) purificada se liga e ativa LmCRK3, *in vitro*. A atividade do complexo é ainda dose dependente, sendo que a atividade máxima da quinase obtida na razão 1:1 (GOMES et al., 2010). Baseando-se nesses dados da literatura, pode-se sugerir que a atividade de CRK3 não seria alterada caso não haja quantidade suficiente de *CycA*.

Com intuito de verificar se a concentração de ciclina iria alterar a progressão do ciclo celular de *L. mexicana*, o gene *CycA* (LmxM.25.1470) foi também clonado no vetor de superexpressão. *CycA* é uma ciclina mitótica e não apresenta homólogos em outros tripanosomatídeos. Já em outras espécies de *Leishmania*, foram identificados complexos CRK3:CYC1 (homólogo de *CycA*) em *L. donovani* e *CycA* em *L. major*. (BANERJEE et al., 2006; GOMES et al., 2010). Vale ressaltar que ciclinas mitóticas são proteínas reguladoras que controlam mitose em todos os eucariotos e se ligam a CDK1 e homólogos. Sendo assim, *CycA* também pode ser um alvo molecular para novos fármacos anti-*Leishmania* (PETRI et al., 2007; GOMES et al., 2010).

A clonagem de *CycA* foi realizada da mesma forma que do gene *CRK3*, utilizando o gene complementar reverso, sem stop códon. Este foi inserido no plasmídeo pVY107, após linearização com NcoI, sendo o GFP fusionado à porção C-terminal (Figura 15). Observa-se que a única diferença entre os vetores é o gene de interesse e as outras características, como o gene codificante para resistência a neomicina (G418), são as mesmas presentes no pVY107_CRK3.

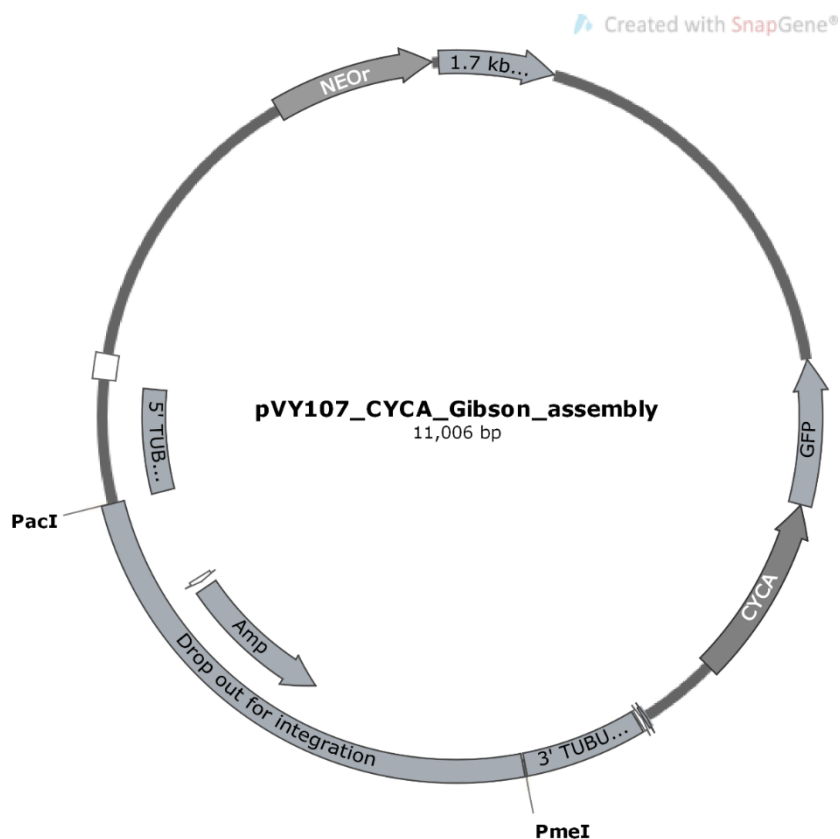


Figura 41 - Representação do plasmídeo pVY107_CYCA após clonagem do gene CYCA. A enzimas de restrição PmeI e PacI utilizadas para linearização do vetor para transfecção em *L. mexicana*. As característircas do vetor estão destacadas, como a região eliminada após digestão com PacI/PmeI (*drop out for integration*); o promotor da resistência bacteriana (*Amp promoter*); região de ligação no gene de tubulia (*5' tubulin* e *3' tubulin*); gene de resistência à neomicina (NEOr). Além dos operadores e promotores necessários para expressão de CRK3 fusionado à GFP em sentido antisenso. pb: pares de bases; IR: região intergênica. Plasmídeo gerado *in silico* com SnapGene® versão 3.3.1.

Os plasmídeos obtidos foram transformados em *E. coli*, assim como para pVY107_CRK3, e confirmados por sequenciamento. Os plasmídeos linearizados (PacI/PmeI) foram então transfectado na cepa T7TR de *L. mexicana* (infectivas). A integração do vetor é na mesma região mostrada na Figura 11 para CRK3.

Duas semanas após a transfecção, dois clones resistentes a neomicina foram obtidos e a cultura de cada clone mantida sob adição de G418. O DNA genômico foi extraído e amplificado por PCR para verificar a integração correta do plasmídeo. A reação de PCR foi realizada com o mesmo par de nucleotídeos utilizados para verificar a integração de CRK3, visto que este se liga a regiões não variáveis do vetor, podendo ser utilizado para toda verificação de superexpressão.

Como pode ser observado na figura 16, ambos os clones apresentaram o fragmento esperado (832 pb) no gel de agarose, confirmando a integração no *locus* de tubulina. Seguindo a denominação anterior, a nova linhagem será descrita no texto de LmCYCA::GFP, clone 1 e clone 2.

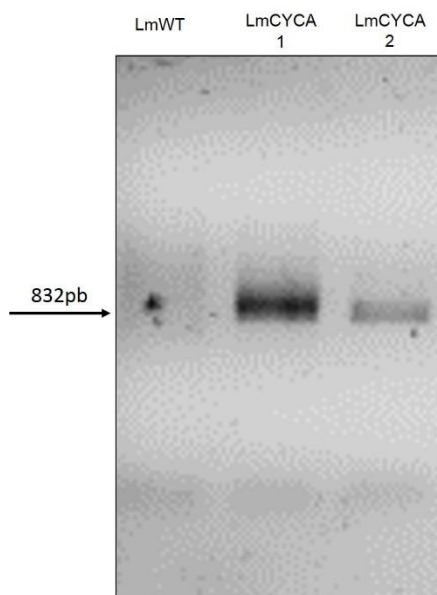


Figura 42– Perfil eletroforético em gel de agarose do produto da PCR após amplificação com os iniciadores OL5604 e OL5605 dos clones de LmCYCA::GFP. O DNA genômico da cepa controle (LmWT, selvagem, não transfectada) e dos clones de LmCYCA::GFP foram extraídos e submetidos à amplificação por PCR. O fragmento esperado de ~832 pb pode ser observado somente nos clones.

Após a confirmação da integração do vetor no *locus* de tubulina, foi realizado *Western blot* a fim de confirmar a expressão da proteína de interesse em formas promastigotas de *L. mexicana*. Assim como CRK3, não existe anticorpo anti-CycA para *L. mexicana*, portanto a expressão da proteína foi visualizada então com anticorpo anti-GFP (Figura 17). Baseando-se no resultado anterior onde foi possível superexpressar CRK3 utilizando 10µg/mL de tet, decidiu-se variar a concentração do antibiótico, a fim de estabelecer a menor concentração que induziria a expressão e as possíveis variações no fenótipo. Portanto, os clones foram cultivados na ausência (0) ou presença das concentrações de 1, 5 e 10 µg/mL de tet por 48 h. Ao controle foi adicionado somente a maior concentração de tet para descartar os efeitos devido à adição do antibiótico. Após as 48 horas, as proteínas foram extraídas e avaliadas por *western blot*. O tamanho predito de CycA é de 35 kDa

(GOMES et al., 2010), enquanto não fusionado ao GFP. O tamanho observado de ~60 kDa corresponde a proteína CycA fusionada ao GFP na porção C-terminal.

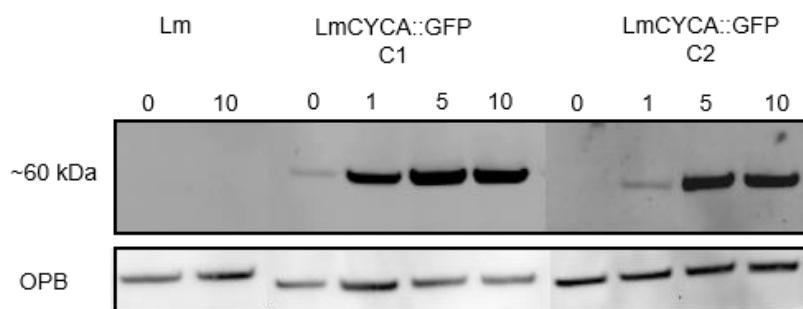


Figura 43- Western blot demonstrando a superexpressão induzida de CYCA em promastigotas de *L. mexicana* após cultivo com tetraciclina. Anticorpo Anti-GFP diluído 1:1000 (Abcam, Anti-GFP antibody - ChIP Grade (ab290)) seguido de anticorpo secundário Anti-IgG HRP-conjugated raised in rabbit (1:5000) foi utilizado para identificar a expressão da proteína. Anticorpo Anti-OPB (MUNDAY et al., 2011) (1:20000) foi usado como controle. Lm: controle, cepa T7TR sem o plasmídeo com CYCA; LmCYCA::GFP C1: clone 1 da cepa transfectada com o plasmídeo; LmCYCA::GFP C2 clone 2 da cepa transfectada com o plasmídeo. 0, 1, 5, 10: concentrações em µg/mL de tetraciclina.

Observando a Figura 17, nota-se que ambos os clones expressam CycA após indução com tetraciclina, inclusive nas menores concentrações, 1 e 5 µg/mL. A possibilidade de induzir a expressão de uma proteína endógena em *L. mexicana* com diferentes dosagens, permite utilizar o vetor para sugerir a função biológica da proteína, visto que pode-se verificar alterações no fenótipo do protozoário após a indução. Além disso, não existem trabalhos analisando o efeito da depleção, silenciamento ou expressão do gene *CycA* em *L. mexicana*, tornando este vetor extremamente útil para o entendimento da função da ciclina no ciclo celular (GOMES et al., 2010; PRELICH, 2012). O clone 1 apresentou expressão da proteína sem adição de tet, indicando um possível “vazamento” ou ausência de repressão do repressor de tet. Devido a isso, o clone 2 foi utilizado para demais análises, já que não foi observada expressão sem indução.

Como dito anteriormente, foi descrito que ciclinas homólogas a *CycA* de eucariotos e de espécies de *Leishmania* controlam a progressão na fase S e a transição G2-M do ciclo celular (ALI et al., 2010; MAITY; GOSWAMI; SAHA, 2011;

HYDBRING; MALUMBRES; SICINSKI, 2016). Para verificar se a indução de expressão de CycA alterara a proliferação do parasito, 10 µg/mL de tet foi adicionada (ou não, controle) em culturas de promastigotas e a densidade celular avaliada por contagem direta por 7 dias (Figura 18). Para controle foi utilizada a cepa sem a transfecção com o plasmídeo contendo CycA, com ou sem adição de tet. Como pode ser observado, o padrão da curva de crescimento é semelhante no controle induzido ou não, assim como na cultura da cepa sem adição de tet. Confirmando assim, que a adição de tet não afeta a proliferação do parasito. Por outro lado, a superexpressão de CycA retardou o crescimento da população.

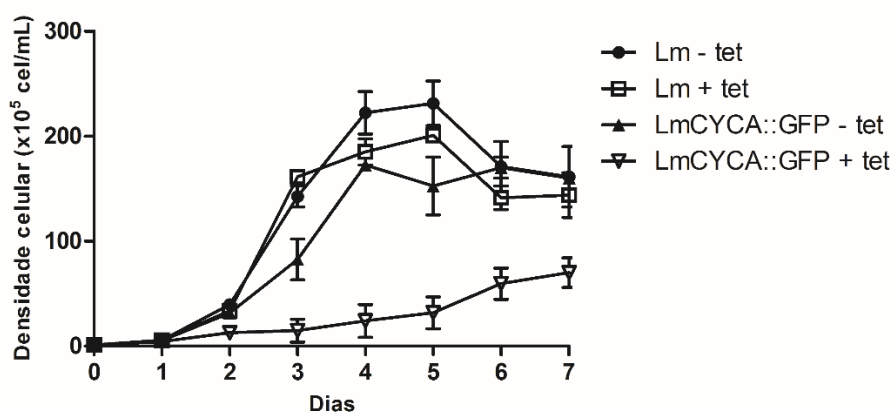


Figura 44 – Curva de crescimento de promastigotas de *L. mexicana* com (+tet) ou sem (-tet) adição de tetraciclina. A cepa selvagem, Lm e o clone da cepa transformada LmCYCA::GFP foram incubados ou não com tetraciclina e a densidade celular avaliada por 7 dias.

Não existem dados até o momento sobre a o efeito da superexpressão de CycA em *L. mexicana* e os dados existentes sobre o envolvimento desta ciclina e a proliferação celular, são em sua maioria, relacionados às células de mamíferos. A superexpressão ectópica de ciclina A ou E aceleram a transição da fase G1 para fase S, aumentando a população desta fase e causando atraso na progressão do ciclo (CHIBAZAKURA et al., 2004; TANE; CHIBAZAKURA, 2009). A superexpressão de ciclina E tem efeito direto na progressão do ciclo e em alguns casos, impede a divisão celular, gerando células poliploides (KECK et al., 2007). Outro exemplo interessante foi demonstrado por Tang et al. (2013), onde a superexpressão de ciclina A em linhagem de mamíferos infectadas com um circovírus (PCV2), inibiu a propagação do vírus, enquanto a superexpressão de

CDK2 não interferiu na proliferação do mesmo. Demonstrando assim, que a replicação do vírus é dependente das fase S e G2/M do hospedeiro e que os níveis de expressão de CycA tem papel fundamental no ciclo de vida do vírus (TANG *et al*, 2013).

Visto que a superexpressão de CycA em células de mamíferos altera o perfil do ciclo celular, este foi verificado por citometria de fluxo. O conteúdo do DNA do clone e da cepa selvagem foi avaliado 48 h após a indução com 10µg/mL de tet. Como controle, as cepas foram cultivadas na ausência de tet. Após a incubação, os parasitos foram marcados com iodeto de propídeo e analisados em citômetro de fluxo (Figura 19).

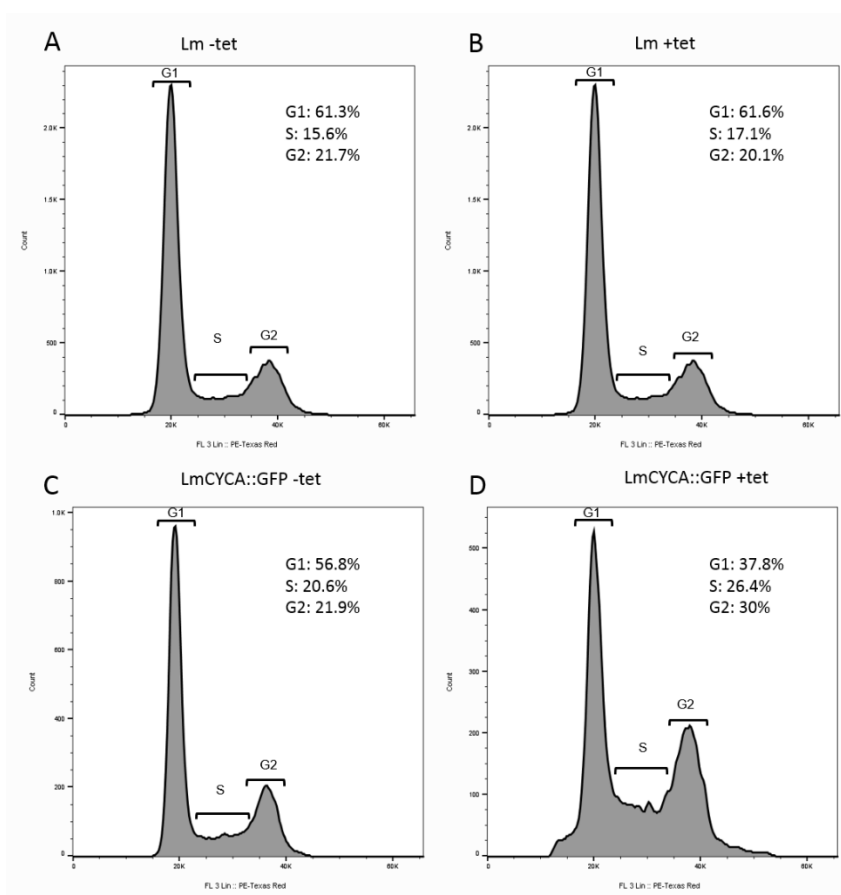


Figura 45 - Análise do conteúdo de DNA e perfil do ciclo celular após indução da cepa LmCYCA::GFP e Lm por citometria de fluxo. As cepas foram induzidas por 48 h com 10µg/mL de tet (+Tet, B e D) e comparadas com populações não induzidas (-Tet, A e C). Os números indicam a porcentagem de células em cada fase do ciclo celular. A porcentagem de parasitos em cada fase do ciclo foi calculada com o software FlowJo®.

Pode-se observar que a adição de tetraciclina não alterou a porcentagem da população em cada fase do ciclo na cepa selvagem (Figura 19B). No entanto, a cepa transformada LmCYCA::GFP sofreu alteração após a indução (Figura 19D), com aumento de populações nas fases S e G2. Sugerindo que ocorre algum impedimento na progressão da mitose e as células não completam a divisão celular. Os resultados são semelhantes aos encontrados na literatura quando homólogos de CycA são superexpressos em outros tipos celulares (CHIBAZAKURA et al., 2004; TANE; CHIBAZAKURA, 2009). Em *L. donovani*, a expressão de Cyc1, homólogo de CycA, aumenta a abundância de parasitos durante a fase S, assim como demonstrado aqui para *L. mexicana* (BANERJEE et al., 2006). Além disso, a fosforilação de histonas pelo complexo LdCYC1:CRK3 sugere a participação das proteínas na fase S (MAITY; GOSWAMI; SAHA, 2011).

Interessantemente, resultados similares de inibição de proliferação e alteração no ciclo celular foram obtidos por alguns autores quando CRK3 é inibida ou o gene é subregulado (HASSAN et al., 2001; WALKER et al., 2011; DUNCAN et al., 2016). A inibição de CRK3 pode acarretar no aumento de ciclina no interior das células, já que não haveria quinase suficiente para formação do complexo CRK3:CycA e progressão do ciclo. Portanto, o excesso de CycA pode ser o responsável pelas alterações observadas. Com os resultados demonstrados aqui e os existentes na literatura sobre a expressão de CRK3 e ciclina A de *L. mexicana*, podemos sugerir que o equilíbrio é essencial para proliferação do parasito e ciclo celular. Além disso, o nível de expressão de CycA é um fator determinante para replicação dos parasitos.

4.2 Superexpressão de ciclina A em amastigotas de *L. mexicana*

Além da proliferação de promastigotas, um fator importante no ciclo de vida e virulência de *Leishmania* é o processo de diferenciação (KAYE; SCOTT, 2011). O ciclo de vida consiste em diferentes estágios: promastigotas procíclicas e metacíclicas extracelulares, que infectam o trato intestinal do inseto vetor e amastigotas intracelulares, que se multiplicam dentro de macrófagos de mamíferos. Portanto, durante o processo de infecção, as formas se diferenciam e se adaptam aos diferentes hospedeiros. Vale ressaltar que as formas metacíclicas e

amastigotas são patogênicas e utilizadas para identificação de fatores de virulência, bem como descoberta de novos fármacos, *in vitro* e *in vivo*. Portanto, o processo de diferenciação em amastigotas é de grande importância na busca por tratamentos, visto que ao inibir algum destes processos, a doença poderia ser eliminada (BESTEIRO et al., 2007; BATES, 2008; KAYE; SCOTT, 2011; FIEBIG; KELLY; GLUENZ, 2015; DOEHL et al., 2017).

Os processos que controlam a diferenciação em espécies de *Leishmania* não estão completamente elucidados. No entanto, sabe-se que estes são, em sua maioria, regulados a nível pós transcricional (DE PABLOS; FERREIRA; WALRAD, 2016). Uma das dificuldades de estabelecer e elucidar as moléculas envolvidas na diferenciação, é a dificuldade de cultivar formas amastigotas axênicas (sem a presença de células do hospedeiro) de *Leishmania in vitro*. Para *L. mexicana*, foi descrito um método de diferenciação *in vitro* de promastigotas em amastigotas baseado na elevação da temperatura, acidificação do pH e alteração do meio de cultura (BATES et al., 1992).

A fim de verificar se a superexpressão de CycA alteraria a diferenciação de promastigotas em amastigotas, a cepa transformada LmCYCA::GFP foi induzida com tetraciclina e inoculada em meio para amastigotas. A alteração morfológica foi avaliada diariamente por contagem em microscópio óptico. Como foi observado por *western blot* que 5µg/mL de tet é suficiente para indução da expressão, esta concentração foi utilizada para o experimento, com intuito de minimizar os danos e menor proliferação ocasionados pelo excesso de CycA.

Para realização do experimento, formas promastigotas da cepa selvagem e da transfectada foram cultivadas e no quinto dia, foi adicionado 5µg/mL de tet. Como controle, foram utilizadas ambas as cepas sem adição do antibiótico. Após dois dias de indução (totalizando 7 dias de cultura), os parasitos foram centrifugados e ressuspensos em meio para diferenciação de amastigotas (descrito em métodos 3.7.2). A densidade celular foi avaliada diariamente e a morfologia de promastigotas e amastigotas foi verificada baseando-se em características como: promastigotas formas flageladas e alongada; amastigotas formas ovais e sem flagelo aparente.

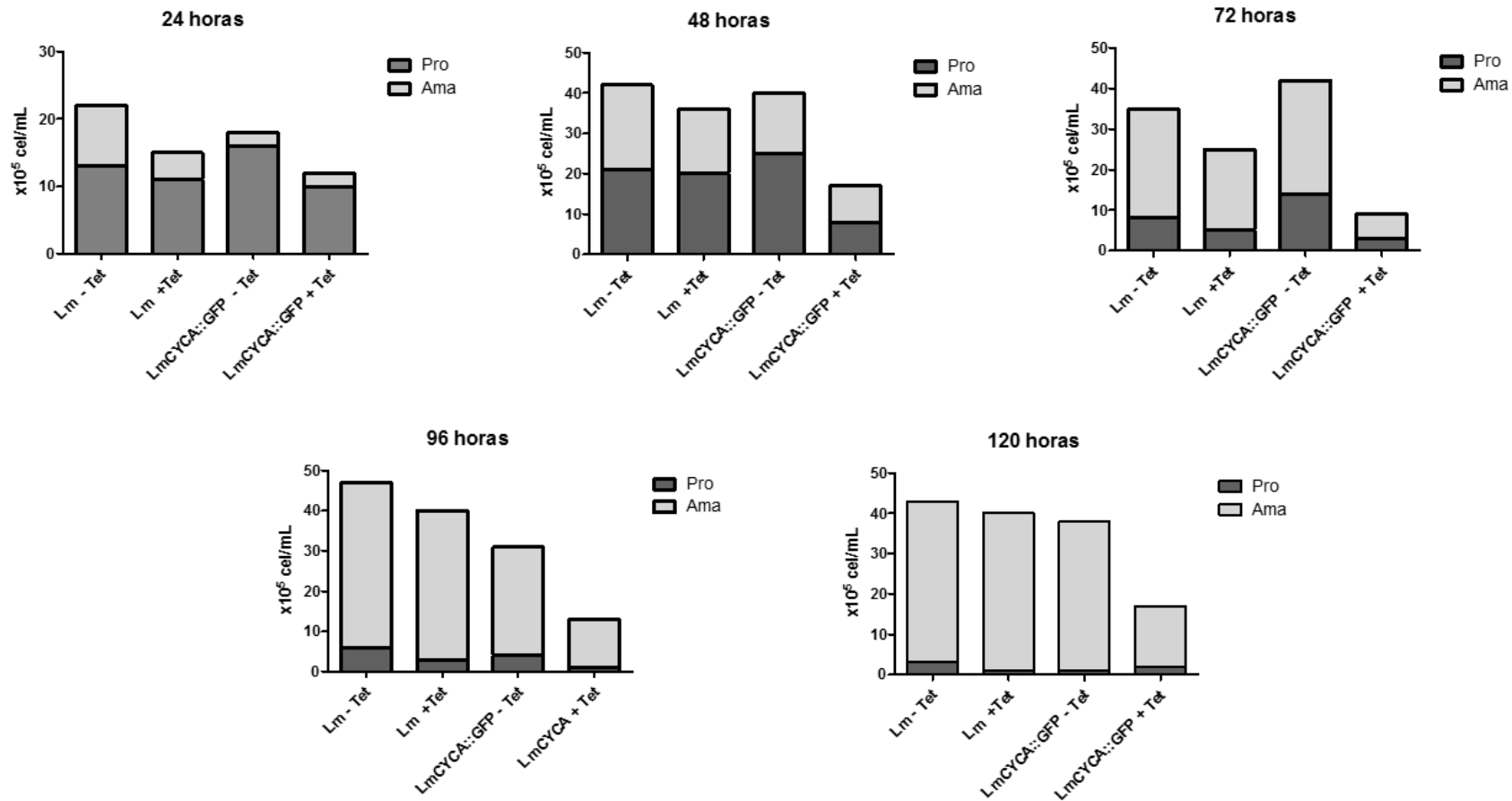


Figura 46- Representação gráfica da densidade celular e diferenciação em amastigotas de *L. mexicana* superexpressando *CycA*. Cada gráfico representa a densidade celular (1×10^5 cel/mL da cepa selvagem (Lm) e da transformada (LmCYCA::GFP) em horas após a inoculação no meio para amastigotas. Tetraciclina foi utilizada anteriormente a troca de meio de cultura. Pro: promastigotas; Ama: amastigotas axênicas.

Na figura 20 observamos que promastigotas induzidas com tet por 48 horas não perdem a habilidade de se diferenciarem em amastigotas. Em todos os tempos analisados, a quantidade de amastigotas foi proporcionalmente igual a quantidade de promastigotas para os controles e a cepa transformada. No entanto, a proliferação do parasito foi alterada. Assim como na curva de crescimento, LmCYCA::GFP após indução com tet apresentou menor densidade celular. Confirmando mais uma vez o envolvimento da ciclina A no ciclo celular de *L. mexicana*. E pela primeira vez, sugere-se que esta ciclina não está envolvida no processo de diferenciação de promastigotas em amastigotas *in vitro*.

Após confirmar que o modelo de superexpressão é viável para utilização em promastigotas e que não altera a diferenciação em amastigotas, foi verificado se poderia ser utilizado em amastigotas. Como dito anteriormente, essa forma é a de maior interesse na busca de fármacos, sendo a forma encontrada no hospedeiro vertebrado (homem) (KAYE; SCOTT, 2011). No entanto, durante a execução do trabalho, o grupo que gerou o modelo e a cepa demonstrou que a expressão de T7 e TetR é subregulada em promastigotas metacíclicas e amastigotas (ISHEMGULOVA et al., 2016).

O sistema usado é limitado a proteínas expressas na forma promastigotas procíclicas, visto que a expressão heteróloga de T7 e TetR que controlam a superexpressão são flanqueados por UTRs derivadas de calmodulina, gene subregulado em metacíclicas e amastigotas. De fato, o transcriptoma demonstrou que a abundância de mRNA de calmodulina em *Leishmania* é reduzida durante a diferenciação de procíclicas para metacíclicas e amastigotas (ASLETT et al., 2010; DILLON et al., 2015; ISHEMGOLOVA et al., 2016).

A fim de confirmar a limitação do modelo, promastigotas da cepa LmCYCA::GFP foram diferenciadas em amastigotas axênicas *in vitro* e induzidas com 10 µg/mL de tet. Após 48 horas, as amastigotas foram preparadas para análise da expressão por *western blot* (Figura 21).

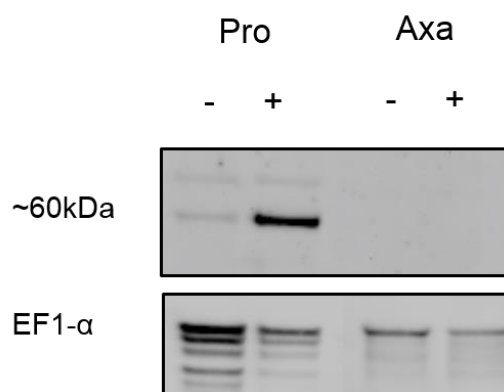


Figura 47– Western blot demonstrando a superexpressão induzida de CYCA em promastigotas e amastigotas axênicas de *L. mexicana* após indução com tetraciclina. Anticorpo Anti-GFP diluído 1:1000 (Abcam, Anti-GFP antibody - ChIP Grade (ab290)) seguido de anticorpo secundário Anti-IgG HRP-conjugated raised in rabbit (1:5000) foi utilizado para identificar a expressão da proteína. Anticorpo Anti-EF1- α (1:10000) foi usado como controle. Lm: controle, cepa T7TR sem o plasmídeo com CYCA; LmCYCA::GFP: cepa transfectada com o plasmídeo. (-): sem tetraciclina; (+): com tetraciclina; PRO: promastigotas; AXA: amastigotas axênicas.

Ao comparar a expressão de promastigotas (PRO) e amastigotas axênicas (AXA) na figura acima, confirmamos que a expressão é subregulada em amastigotas. Não sendo então possível utilizar o método nestas formas.

Visto que o objetivo deste capítulo é desenvolver um modelo para busca por novo fármacos, o modelo funcional somente em formas promastigotas não é o ideal. Assim, foi decidido não utilizar as cepas geradas superexpressando Cyca e CRK3 para validar o sistema de superexpressão como ferramenta para descoberta de novas moléculas contra as proteínas. No entanto, as cepas continuam disponíveis para investigações futuras do papel das proteínas no ciclo celular de *L. mexicana*.

4.3 Aperfeiçoamento do sistema de superexpressão induzida por tetraciclina em *L. mexicana*

Um sistema de superexpressão induzida que seja um modelo para pesquisas na busca de fármacos ou estudos de diferenciação em *L. mexicana*, precisa, necessariamente, ser viável em formas amastigotas e metacíclicas (formas infectivas). Dessa forma, o sistema utilizado até o momento precisa ser

aperfeiçoado para garantir que seja uma ferramenta a mais na busca de tratamentos para leishmanioses.

Como dito anteriormente, foi decidido não mais utilizar as cepas geradas expressando CycA e CRK3. Contudo, visto que a tese foca em novas substâncias e métodos para descoberta de novos fármacos ou alvos, decidiu-se alterar o sistema de superexpressão. De acordo com os autores, a limitação do método está na cepa co-expressando T7 polimerase e repressor de tetraciclina (ISHEMGULOVA et al., 2016). Estes genes são subregulados devido a região promotora e não são expressos em dose suficiente para iniciar a expressão do gene de interesse clonado no vetor. Assim, a estratégia adotada foi de gerar uma nova cepa co-expressando T7 e TetR, a qual permitirá continuar utilizando o plasmídeo pVY107 para clonar o gene de interesse e integrá-lo ao *locus* de tubulina.

Para geração da nova cepa, inicialmente foram gerados os plasmídeos com os genes T7 polimerase e repressor de tetraciclina. A estratégia foi clonar estes genes no vetor pRIB. Este vetor é extensivamente utilizado no laboratório e tem expressão estável, alta e constitutiva após integração na menor região ribossomal em todas as fases do estágio de vida, principalmente em amastigotas. Este fato se deve ao gene de interesse ser flanqueado pela região intergênica de cisteína peptidase B 2.8 de *L. mexicana* (MISSLITZ et al., 2000; NUGENT et al., 2004).

4.3.1 Geração dos plasmídeos pRIB-T7 e pRIB-TetR

Inicialmente, foram gerados os plasmídeos de T7 polimerase e repressor de tetraciclina para co-expressão em *L. mexicana*. O plasmídeo contendo T7 polimerase foi gerado utilizando o vetor pRIB com o gene conferindo resistência a puromicina (pGL631) (Figura 22).

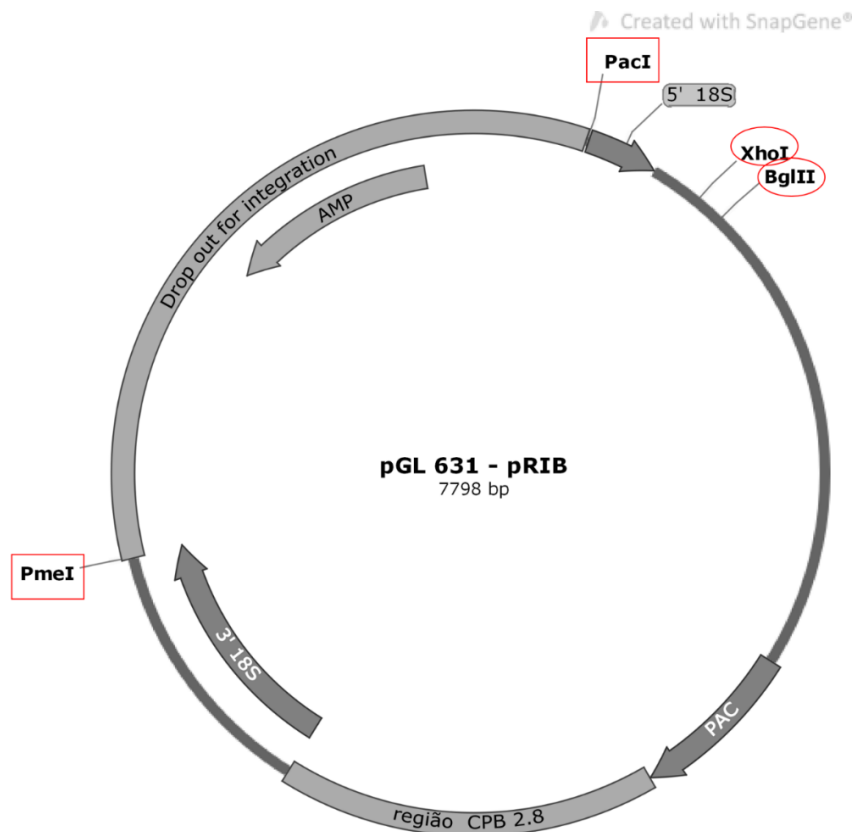


Figura 48 - Representação do plasmídeo pRIB (pGL631) utilizado para inserção do gene de T7 polimerase em *L. mexicana selvagem*. As enzimas de restrição utilizadas no processo de clonagem e transfecção estão destacadas: XhoI e BglII (círculo vermelho) foi utilizada no sítio de clivagem para inserção de T7. Já as enzimas PmeI e PacI (retângulos) utilizadas para linearização do vetor para transfecção em *L. mexicana*. As características do vetor estão destacadas, como a região eliminada após a digestão com PacI/PmeI (drop out for integration); o promotor da resistência bacteriana (Amp promoter); região de ligação ribossomal (5' 18S e 3' 18S); gene de resistência à puromicina (PAC). Além da região promotora CPB 2.8 necessária para expressão de T7. pb: pares de bases. Plasmídeo gerado *in silico* com *NEBuilder Assembly Tool* (<http://nebuilder.neb.com/>) e vetor esquemático para figura com SnapGene® versão 3.3.1.

O gene de T7 polimerase foi obtido por PCR a partir do plasmídeo pVY087 (KRAEVA et al., 2014). Na figura 23A observa-se a confirmação do fragmento correspondente ao gene T7 após realização da amplificação por PCR. O vetor pRIB-PAC foi digerido com as enzimas de restrição XhoI e BglII para inserção do gene amplificado. O gene então foi clonado no vetor pela metodologia descrita no item 3.6.7. Após a reação de recombinação, *E. coli* foi transformada e as colônias avaliadas quanto a presença do gene. Para a avaliação, foi utilizada digestão com enzimas de restrição. No vetor original, pGL631, existe 1 sítio de clivagem para enzima NdeI e no gene de T7 outro sítio de clivagem. Assim, caso o gene esteja inserido no vetor, seria possível observar 2 fragmentos no gel de agarose após a digestão. Seis colônias foram digeridas e o perfil eletroforético demonstrou que apenas a colônia 2 não era positiva (Figura 23B). Após a confirmação, a colônia 3 foi enviada para sequenciamento com o iniciador OL5673. Assim, foi confirmada a correta inserção do gene no plasmídeo e gerado então o novo vetor para expressão de T7 polimerase em *L. mexicana*, pGL2652, pRibPAC-T7.

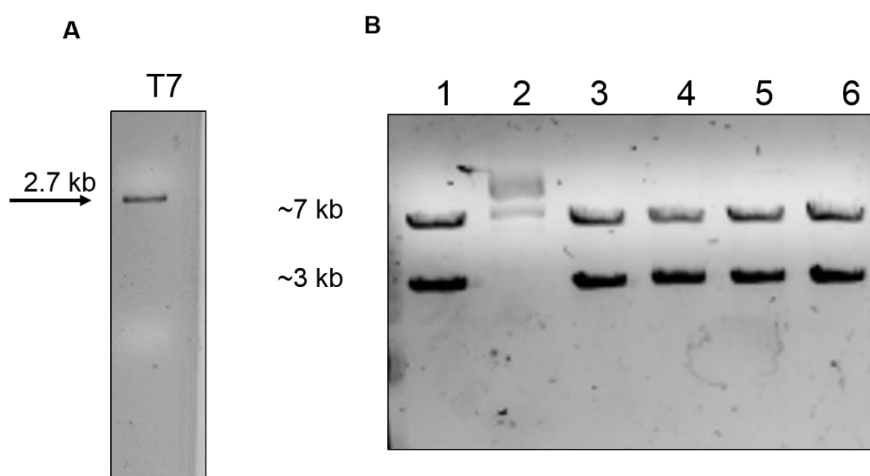


Figura 49- Perfil eletroforético em gel de agarose da construção do plasmídeo pRib-T7. (A) Produto da PCR após amplificação de T7 a partir do pVY087 com os iniciadores OL5672 e OL5673. (B) Fragmentos após a digestão das colônias de *E. coli* com NdeI para confirmação da correta construção do plasmídeo.

O plasmídeo para inserção do repressor de tetraciclina também foi gerado utilizando o vetor pRib, mas nesse caso, com cassete de resistência para higromicina (pGL472) (Figura 24). Dessa forma, é possível selecionar os clones co-expressando T7 e tetR utilizando os dois antibióticos de seleção, puromicina e higromicina.

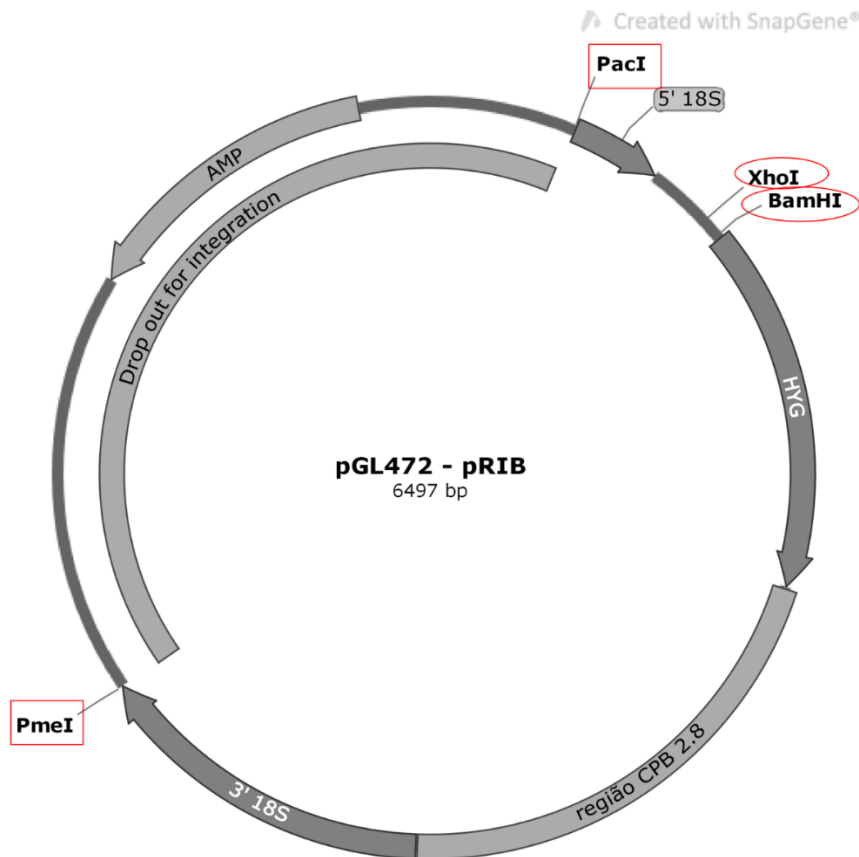


Figura 50 – Representação do plasmídeo pRIB (pGL472) utilizado para inserção do gene de repressor de tetraciclina em *L. mexicana*. As enzimas de restrição utilizadas no processo de clonagem e transfecção estão destacadas: XhoI e BamHI (círculo vermelho) foi utilizada no sítio de clivagem para inserção de TetR. Já as enzimas PmeI e PacI (retângulos) utilizadas para linearização do vetor para transfecção em *L. mexicana*. As características do vetor estão destacadas, como a região eliminada após digestão com PacI/PmeI (*drop out for integration*); o promotor da resistência bacteriana (*Amp promoter*); região de ligação ribossomal (5' 18S e 3' 18S); gene de resistência à higromicina (HYG). Além da região promotora CPB 2.8 necessária para expressão de TetR. pb: pares de bases. Plasmídeo gerado *in silico* com *NEBuilder Assembly Tool* (<http://nebuilder.neb.com/>) e vetor esquemático para figura com SnapGene® versão 3.3.1.

O gene tetR foi obtido por PCR a partir do plasmídeo pVY085 (KRAEVA et al., 2014). O fragmento de 952 pb correspondente ao gene, foi confirmado por PCR (Figura 25A) e clonado no vetor após linearização com as enzimas de restrição destacadas na figura anterior, XhoI e BamHI. Assim como para os outros plasmídeos, este foi gerado por *Gibson assembly* (item 3.6.7). Após a transformação das bactérias, estas foram incubadas em placas durante a noite e no dia seguinte, 10 colônias aleatórias foram coletadas e realizado PCR de colônia para confirmar a positividade dos clones. A confirmação dos clones do plasmídeo pRib-T7 foi utilizando enzima de restrição, visto a possibilidade de obter fragmentos diferentes e presença de enzimas no gene. No caso do contendo tetR, foi utilizada a técnica de PCR de colônia (JACOBUS; GROSS, 2015), já que esta permite a amplificação do gene nos plasmídeos corretos e pode-se observar o fragmento no gel de agarose. Todas as colônias apresentaram o fragmento de ~952 pares de base (Figura 25B). Este resultado ainda confirma a eficiência do método utilizado e que o tamanho da sobreposição escolhido pode ser a razão de tal eficiência (GIBSON et al., 2009; JACOBUS; GROSS, 2015). A colônia 10 foi escolhida para sequenciamento e confirmou a correta integração do gene no vetor, gerando assim o plasmídeo pGL2636, pRibHYG-TetR.

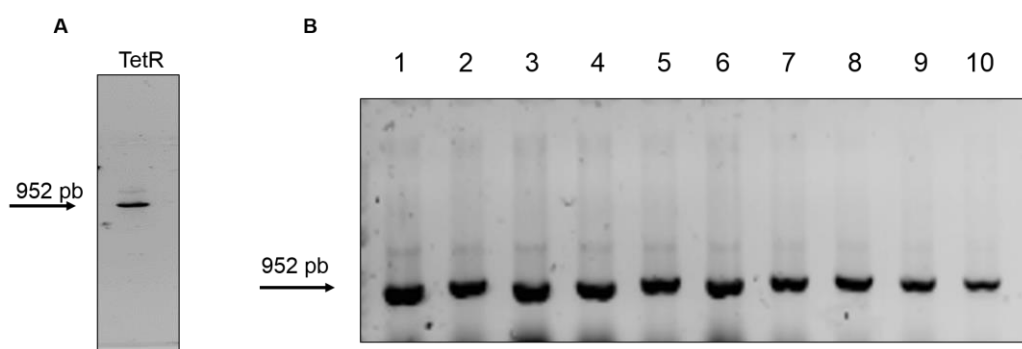


Figura 51- Perfil eletroforético em gel de agarose da construção do plasmídeo pRib-TetR. (A) Produto da PCR após amplificação de tetR a partir do pVY085 com os iniciadores OL5670 e OL5671. (B) Fragmentos após a PCR de 10 colônias aleatórias com o mesmo par de iniciadores para confirmar a presença do gene no plasmídeo.

4.3.2 Transfecção e geração da cepa co-expressando T7TetR

Com os plasmídeos gerados e confirmados, foi definida a abordagem para transformação da cepa selvagem. Vale ressaltar que o principal objetivo do modelo é utilização para estudos de substâncias anti-*Leishmania* e virulência do parasito. Para tal, é importante não só selecionar clones com melhor e maior expressão de T7 polimerase e TetR, mas também manter a virulência e infectividade da cepa gerada. Assim, definimos que a primeira transfecção seria para inserção de T7 polimerase e a segunda para TetR. No entanto, antes da segunda transfecção, a população seria inoculada em camundongo a fim de selecionar a população com habilidade de infectar e gerar a doença. O fluxo da abordagem pode ser visto na figura 26. Ao finalizar as transfecções, os genes ficaram inseridos como exemplificado pela figura 27.

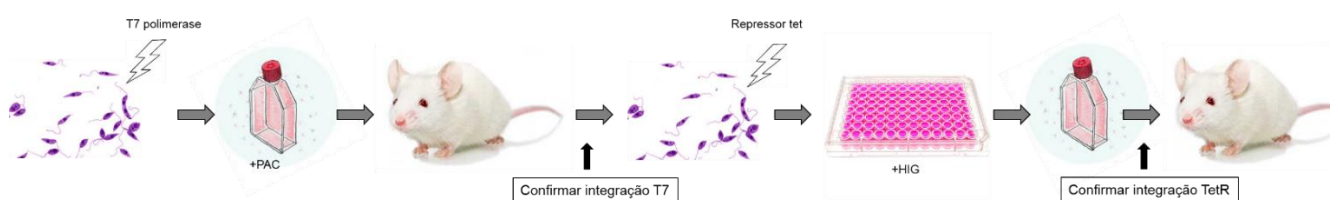


Figura 52 – Representação esquemática do fluxo de transfecção para gerar nova cepa co-expressando T7 e TetR. Promastigotas infectivas foram transfecadas com o novo plasmídeo (pRibPAC-T7) contendo o gene T7 e resistência a puromicina (PAC). Após a recuperação da população transfecada, estas foram inoculadas em camundongo, a fim de manter a virulência. Após a formação das feridas, os parasitos foram coletados e a integração confirmada por PCR e a expressão por qPCR. A população expressando T7 foi então transfecada com TetR (pRibHig-TetR), diluídas em placas com meio contendo a seleção para Hhigromicina (HIG). Após a observação de clones, estes foram confirmados por PCR e a expressão por qPCR. Finalmente, inoculados em camundongo novamente.

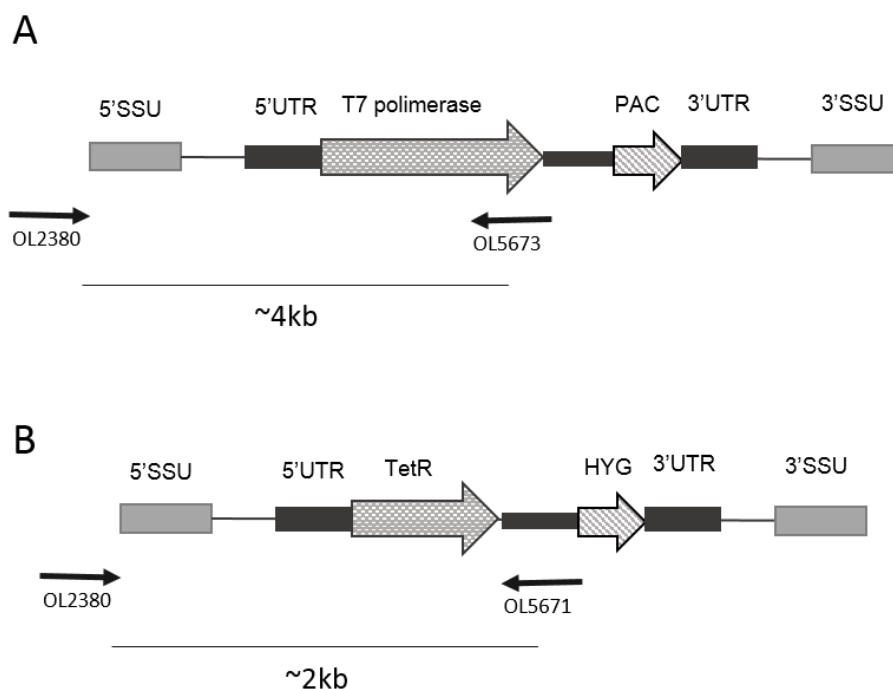


Figura 53 - Representação esquemática dos vetores utilizados na cepa gerada de *L. mexicana*. (A) Cassete de T7 polimerase integrado no *locus* ssu ribosomal. (B) Cassete de repressor de Tet integrado no *locus* ssu ribosomal. Observa-se na figura os iniciadores utilizados para confirmar a integração no *locus* correta. O iniciador OL2380 se liga na região ribossomal de integração, o OL5673 na porção final do gene de T7 polimerase e o OL5671 na porção final de TetR.

Seguindo o fluxo de abordagem, primeiramente, a cepa selvagem de *L. mexicana* foi transfectada com o pGL2652 e mantida sob pressão seletiva com o antibiótico puromicina. Após uma semana, a população resistente, indicativo de correta integração do vetor, foi avaliada quanto à integração do plasmídeo no ribossomo. Foi realizado PCR para amplificação do fragmento utilizando os iniciadores OL2380 e OL5673, os quais geram um fragmento de ~4kb, caso a integração tenha sido correta. O perfil eletroforético do gel de agarose confirma a correta integração do vetor (Figura 28). Após a confirmação da integração, a população foi inoculada em camundongo.

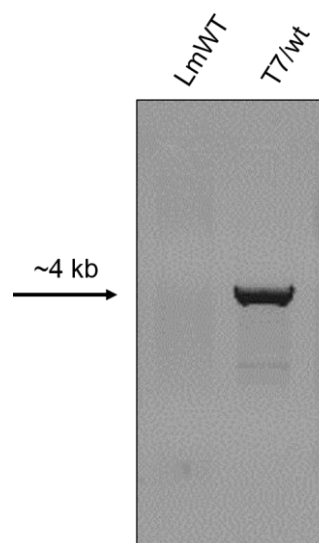


Figura 54- Perfil eletroforético em gel de agarose do produto da PCR após amplificação com os iniciadores OL2380 e OL5673 da população após transfecção com pGL2652.. O DNA genômico da cepa controle (LmWT, selvagem, não transfectada) e da população foram extraídos e submetidos à amplificação por PCR. O fragmento esperado de ~4kb pode ser observado somente na população transfectada.

Devido ao tempo durante o doutorado sanduíche, não foi possível finalizar a nova cepa. Não conseguimos obter anticorpo anti-T7 para validar a expressão da polimerase em tempo hábil durante o sanduíche. No entanto, todo o material e protocolos foram deixados para finalização do trabalho.

Os experimentos para finalização foram realizados após o término do sanduíche pelas pós-graduandas. Nicola Baker e Carolina Catta-Preta. Após a retirada da cepa do camundongo, foi realizado qPCR para confirmar a expressão de T7 polimerase e após a confirmação, o plasmídeo gerado de TetR, pGL2636, foi então transfectado. Nessa etapa, se fez necessário a clonagem após a transfecção (Figura 26), a fim de obter uma população clonal. Os clones são mantidos sempre em pressão seletiva com os dois antibióticos: puromicina e higromicina. A integração de TetR foi confirmada com os iniciadores demonstrados na figura 27B e a expressão validada também por qPCR.

Até o momento, ensaios estão sendo realizados para validação do método para busca de novos fármacos e expressão induzida em formas amastigotas, utilizando o plasmídeo gerado com o gene CRK3. Em primeiro teste, foi confirmado

que a nova cepa transfectada com pVY_CRK3, expressa a quinase em formas amastigotas e promastigotas após adição de tetraciclina. Os dados confirmam que a ferramenta atual é viável em ambas as formas e será utilizada para geração de biblioteca de superexpressão de proteína quinases.

5. CONCLUSÃO DO CAPÍTULO

Pela primeira vez foi demonstrado que é possível induzir a expressão de proteína endógena de *L. mexicana*. A indução de proteína quinase CRK3 e da ciclina A, demonstrou que o complexo CRK3-CycA é essencial para manutenção do ciclo celular de *L. mexicana*. A superexpressão dessas pode ser utilizada para analisar as alterações fenotípicas e inferir funções de proteínas, bem como compreender a complexa biologia do parasito.

Ainda, o aperfeiçoamento do modelo permitiu a indução da expressão em promastigotas e amastigotas axênicas, podendo ser utilizado agora para geração da biblioteca de superexpressão bem como ferramenta na avaliação de novos fármacos.

3. CONCLUSÃO FINAL

- As duas abordagens utilizadas resultaram em dados inéditos que permitem a continuação tanto dos trabalhos fitoquímicos quanto os moleculares;
- O alcaloide indólico pode ser aperfeiçoado a fim de aumentar a atividade frente à tripanosomatídeos, bem como ser avaliado em outros modelos;
- A nova linhagem de *Leishmania mexicana* gerada será utilizada para construção de uma biblioteca de superexpressão de proteínas a qual será uma nova ferramenta para varreduras de novas substâncias anti-*Leishmania*.

REFERÊNCIAS

ABAD-FRANCH, F.; SANTOS, W. S.; SCHOFIELD, C. J. Research needs for Chagas disease prevention. **Acta Tropica**, v. 115, p. 44–54, 2010.

ACHTERBERG, V.; GERCKEN, G. Cytotoxicity of ester and ether lysophospholipids on *Leishmania donovani* promastigotes. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 23, n. 2, p. 117–22, mar. 1987.

ADEMAR, A.; FILHO, S.; COSTA, E. S.; CUNHA, W. R.; SILVA, M. L. A.; NANAYAKKARA, N. P. D.; BASTOS, J. K. *In vitro* Antileishmanial and Antimalarial Activities of Tetrahydrofuran Lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). v. 1310, n. December 2007, p. 1307–1310, 2008.

ALCÂNTARA, J. M. **BIOPROSPECÇÃO DE ESPÉCIES AMAZÔNICAS DA FAMÍLIA LAURACEAE COM POTENCIAL AROMÁTICO E MEDICINAL**. 2009. Universidade Federal do Amazonas, 2009.

ALCÂNTARA, J.; YAMAGUCHI, K.; VEIGA JUNIOR, V. da. Óleos essenciais de *Sextonia rubra* (Mez) van der Werff (Lauraceae). **Acta Amazonica**, v. 43, n. 1, p. 113–116, 2013.

ALEXANDER, J.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. *Leishmania mexicana* cysteine proteinase-deficient mutants have attenuated virulence for mice and potentiate a Th1 response. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 161, n. 12, p. 6794–801, 15 dez. 1998.

ALI, N. O. M.; IBRAHIM, M. E.; GRANT, K. M.; MOTTRAM, J. C. Molecular cloning, characterization and overexpression of a novel cyclin from *Leishmania mexicana*. **Pakistan Journal of Biological Sciences**, v. 13, n. 16, p. 775–784, 2010.

ALVES, R. T.; REGASINI, L. O.; FUNARI, C. S.; YOUNG, M. C. M.; RIMOLDI, A.; DA SILVA BOLZANI, V.; SILVA, D. H. S.; DE ALBUQUERQUE, S.; DA ROSA, J. A. Trypanocidal activity of Brazilian plants against epimastigote forms from Y and Bolivia strains of *Trypanosoma cruzi*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 3, p. 528–533, 2012.

ALVIANO, D. S.; BARRETO, A. L. S.; DIAS, F. D. A.; RODRIGUES, I. D. A.; ROSA, M. D. S. D. S.; ALVIANO, C. S.; SOARES, R. M. D. A. Conventional therapy and promising plant-derived compounds against trypanosomatid parasites. **Frontiers in microbiology**, v. 3, n. August, p. 1–10, jan. 2012.

ALZATE, J. F.; ARIAS, A. A.; MORENO-MATEOS, D.; ÁLVAREZ-BARRIENTOS, A.; JIMÉNEZ-RUIZ, A. Mitochondrial superoxide mediates heat-induced apoptotic-like death in *Leishmania infantum*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 152, p. 192–202, 2007.

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

AMIRKIA, V.; HEINRICH, M. Alkaloids as drug leads - A predictive structural and biodiversity-based analysis. **Phytochemistry Letters**, v. 10, p. xlviii–liiii, 2014.
ANISZEWSKI, T. **Alkaloids - Secrets of Life Alkaloid Chemistry, Biological Significance, Applications and Ecological Role**. 1. ed. Oxford: Elsevier, 2007.

APERS, S.; VLIETINCK, A.; PIETERS, L. Lignans and neolignans as lead compounds. **Phytochemistry Reviews**, v. 2, n. Figure 1, p. 201–217, 2003.

ARAUJO, A.; CECÍLIA, I.; CATHERINE, L.; CAROLINA, M.; SOUZA, W. De; RENATO, C.; CRISTINA, M.; MOTTA, M. How Trypanosoma cruzi handles cell cycle arrest promoted by camptothecin, a topoisomerase I inhibitor. **Molecular & Biochemical Parasitology**, v. 193, n. 2, p. 93–100, 2014.

ARNOLDO, A.; KITTANAKOM, S.; HEISLER, L. E.; MAK, A. B.; SHUKALYUK, A. I.; TORTI, D.; MOFFAT, J.; GIAEVER, G.; NISLOW, C. A genome scale overexpression screen to reveal drug activity in human cells. **Genome medicine**, v. 6, n. 4, p. 32, 2014.

ASLETT, M.; AURRECOECHEA, C.; BERRIMAN, M.; BRESTELLI, J.; BRUNK, B. P.; CARRINGTON, M.; DEPLEDGE, D. P.; FISCHER, S.; GAJRIA, B.; GAO, X.; GARDNER, M. J.; GINGLE, A.; GRANT, G.; HARB, O. S.; HEIGES, M.; HERTZFOWLER, C.; HOUSTON, R.; INNAMORATO, F.; IODICE, J.; KISSINGER, J. C.; KRAEMER, E.; LI, W.; LOGAN, F. J.; MILLER, J. A.; MITRA, S.; MYLER, P. J.; NAYAK, V.; PENNINGTON, C.; PHAN, I.; PINNEY, D. F.; RAMASAMY, G.; ROGERS, M. B.; ROOS, D. S.; ROSS, C.; SIVAM, D.; SMITH, D. F.; SRINIVASAMOORTHY, G.; STOECKERT, C. J.; SUBRAMANIAN, S.; THIBODEAU, R.; TIVEY, A.; TREATMAN, C.; VELARDE, G.; WANG, H. TriTrypDB: a functional genomic resource for the Trypanosomatidae. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. Database, p. D457–D462, 1 jan. 2010.

BAHIA, M. T.; NASCIMENTO, A. F. S.; MAZZETI, A. L.; MARQUES, L. F.; GONÇALVES, K. R.; MOTA, L. W. R.; DE DINIZ, L. F.; CALDAS, I. S.; TALVANI, A.; SHACKLEFORD, D. M.; KOLTUN, M.; SAUNDERS, J.; WHITE, K. L.; SCANDALE, I.; CHARMAN, S. A.; CHATELAIN, E. Antitrypanosomal activity of fexinidazole metabolites, potential new drug candidates for Chagas disease. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 8, p. 4362–4370, 2014.

BANERJEE, S.; SEN, A.; DAS, P.; SAHA, P. Leishmania donovani cyclin 1 (LdCyc1) forms a complex with cell cycle kinase subunit CRK3 (LdCRK3) and is possibly involved in S-phase-related activities. **FEMS Microbiology Letters**, v. 256, n. 1, p. 75–82, 2006.

BARREIRO, E. J.; BOLZANI, V. D. S. Biodiversidade: fonte potencial para a descoberta de fármacos. **Química Nova**, v. 32, n. 3, p. 679–688, 2009.

BARRETT, M. P.; CROFT, S. L. Management of trypanosomiasis and leishmaniasis. **British Medical Bulletin**, v. 104, n. 1, p. 175–196, 2012.

BARROSO, G. M.; PEIXOTO, A.; ICHASO, C.; GUIMARÃES, E. **Sistemática de Angiospermas do Brasil - Volume 1**. 2. ed. [s.l.] UFV, 2007.

BASILE, L.; JANSÁ, J. M.; CARLIER, Y.; SALAMANCA, D. D.; ANGHEBEN, A.; BARTOLONI, A.; SEIXAS, J.; VAN GOOL, T.; CANAVATE, C.; FLORES-CHAVEZ, M.; JACKSON, Y.; CHIODINI, P. L.; ALBAJAR-VINAS, P. Chagas disease in European countries: the challenge of a surveillance system. **Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, v. 16, p. 1–10, 2011.

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

BATES, P. A.; ROBERTSON, C. D.; TETLEY, L.; COOMBS, G. H. Axenic cultivation and characterization of *Leishmania mexicana* amastigote-like forms. **Parasitology**, v. 105 (Pt 2, p. 193–202, out. 1992.

BEECH, E.; RIVERS, M.; OLDFIELD, S.; SMITH, P. P. GlobalTreeSearch – the first complete global database of tree species and country distributions. **Journal of Sustainable Forestry**, v. 0, n. 0, p. 10549811.2017.1310049, 2017.

BEGOLO, D.; ERBEN, E.; CLAYTON, C. Drug target identification using a trypanosome overexpression library. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 10, p. 6260–6264, 2014.

BERENS, C.; HILLEN, W. Gene regulation by tetracyclines: Constraints of resistance regulation in bacteria shape TetR for application in eukaryotes. **European Journal of Biochemistry**, v. 270, n. 15, p. 3109–3121, 2003.

BERENS, R. L.; BRUN, R.; KRASSNER, S. M. A simple monophasic medium for axenic culture of hemoflagellates. **The Journal of parasitology**, v. 62, n. 3, p. 360–5, jun. 1976.

BERGER, I.; PASSREITER, C. M.; CÁCERES, A.; KUBELKA, W. Antiprotozoal activity of *Neurospora crassa*. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 327–330, 2001.

BERTANI, G. STUDIES ON LYSOGENESIS I. THE MODE OF PHAGE LIBERATION BY LYSOGENIC *ESCHERICHIA COLI*1. **Journal of bacteriology**, v. 62, n. 3, p. 293–300, 1951.

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

BILATE, A. M. B.; CUNHA-NETO, E. **Chagas disease cardiomyopathy: Current concepts of an old disease** *Revista do Instituto de Medicina Tropical de Sao Paulo*, 2008.

BOREN, J.; BRINDLE, K. M. Apoptosis-induced mitochondrial dysfunction causes cytoplasmic lipid droplet formation. **Cell Death and Differentiation**, v. 19, n. 9, p. 1561–1570, 2012.

BORGEAUD, S.; BLOKESCH, M. Overexpression of the tcp Gene Cluster Using the T7 RNA Polymerase/Promoter System and Natural Transformation-Mediated Genetic Engineering of *Vibrio cholerae*. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, p. 1–10, 2013.

BORGES, V. M.; LOPES, U. G.; DE SOUZA, W.; VANNIER-SANTOS, M. a. Cell structure and cytokinesis alterations in multidrug-resistant *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Parasitology Research**, v. 95, p. 90–96, 2005.

BRADFORD, M. M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical biochemistry**, v. 72, p. 248–54, 7 maio 1976.

BREITLING, R.; KLINGNER, S.; CALLEWAERT, N.; PIETRUCHA, R.; GEYER, A.; EHRLICH, G.; HARTUNG, R.; MÜLLER, A.; CONTRERAS, R.; BEVERLEY, S. M.; ALEXANDROV, K. Non-pathogenic trypanosomatid protozoa as a platform for protein research and production. **Protein Expression and Purification**, v. 25, n. 2, p. 209–218, 2002.

BRINGMANN, G.; DREYER, M.; FABER, J. H.; DALSGAARD, P. W.; STAERK, D.; JAROSZEWSKI, J. W.; NDANGALASI, H.; MBAGO, F.; BRUN, R.; REICHERT, M.; MAKSIMENKA, K.; CHRISTENSEN, S. B. Ancistrotanzanine A, the first 5,3'-coupled naphthylisoquinoline alkaloid, and two further, 5,8'-linked related compounds from the newly described species *Ancistrocladus tanzaniensis*. **Journal of natural products**, v. 66, p. 1159–1165, 2003.

BRINGMANN, G.; HAMM, A.; GÜNTHER, C.; MICHEL, M.; BRUN, R.; MUDOGO, V. Ancistroalaines A and B, two new bioactive naphthylisoquinolines, and related naphthoic acids from *Ancistrocladus ealaensis*. **Journal of Natural Products**, v. 63, p. 1465–1470, 2000.

BRINGMANN, G.; MESSER, K.; BRUN, R.; MUDOGO, V. Ancistrocongolines A-D, new naphthylisoquinoline alkaloids from *Ancistrocladus congolensis*. **Journal of Natural Products**, v. 65, p. 1096–1101, 2002.

BRITTA, E.; SCARIOT, D.; FALZIROLLI, H.; UEDA-NAKAMURA, T.; SILVA, C.; FILHO, B.; BORSALI, R.; NAKAMURA, C. Cell death and ultrastructural alterations in *Leishmania amazonensis* caused by new compound 4-Nitrobenzaldehyde thiosemicarbazone derived from S-limonene. **BMC Microbiology**, v. 14, p. 236, 2014.

BROWN, N. R.; NOBLE, M. E.; LAWRIE, A. M.; MORRIS, M. C.; TUNNAH, P.; DIVITA, G.; JOHNSON, L. N.; ENDICOTT, J. A. Effects of Phosphorylation of Threonine 160 on Cyclin-Dependent Kinase 2 Structure and Activity. **The Journal of biological chemistry**, v. 274, n. 13, p. 8746–8756, mar. 1999.

BUXBAUM, L. U.; DENISE, H.; COOMBS, G. H.; ALEXANDER, J.; MOTTRAM, J. C.; SCOTT, P. Cysteine protease B of *Leishmania mexicana* inhibits host Th1 responses and protective immunity. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 171, n. 7, p. 3711–7, 1 out. 2003.

CABRAL, M. M. O.; BARBOSA-FILHO, J. M.; MAIA, G. L. A.; CHAVES, M. C. O.; BRAGA, M. V.; DE SOUZA, W.; SOARES, R. O. A. Neolignans from plants in northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against *Trypanosoma cruzi*. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 319–324, 2010.

CALCUL, L.; ZHANG, B.; JINWAL, U. K.; DICKEY, C. A.; BAKER, B. J. **Natural products as a rich source of tau-targeting drugs for Alzheimer's disease** *Future Medicinal Chemistry*, 2012. .

CARDOSO, E. A.; RODRIGUES, A.; CARVALHO, G. C. De; GUERRA, A.; FRAGA, M.; LETÍCIA, M.; BARBOSA, D. C.; LUIS, A.; CASTRO, H. C.; LIONE, V. Leishmaniasis : History , Evolution of Treatment and the Need for New Drugs. **Current Biotechnology**, 2014.

CARNEIRO, A. L. B.; TEIXEIRA, M. F. S.; OLIVEIRA, V. M. A. De; FERNANDES, O. C. C.; CAUPER, G. S. D. B.; POHLIT, A. M. Screening of Amazonian plants from the Adolpho Ducke forest reserve, Manaus, state of Amazonas, Brazil, for antimicrobial activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 103, n. 1, p. 31–8, mar. 2008.

CASADEI, D. Chagas' disease and solid organ transplantation. **Transplantation proceedings**, v. 42, p. 3354–3359, 2010.

CAYLA, M.; RACHIDI, N.; LECLERCQ, O.; SCHMIDT-ARRAS, D.; ROSENQVIST, H.; WIESE, M.; SPÄTH, G. F. Transgenic analysis of the *Leishmania* MAP kinase MPK10 reveals an auto-inhibitory mechanism crucial for stage-regulated activity and parasite viability. **PLoS pathogens**, v. 10, n. 9, p. e1004347, set. 2014.

CEVALLOS, A. M.; SEGURA-KATO, Y. X.; MERCHANT-LARIOS, H.; MANNING-CELA, R.; ALBERTO HERNÁNDEZ-OSORIO, L.; MÁRQUEZ-DUEÑAS, C.; AMBROSIO, J. R.; REYNOSO-DUCOING, O.; HERNÁNDEZ, R. *Trypanosoma cruzi*: Multiple actin isovariants are observed along different developmental stages. **Experimental Parasitology**, v. 127, n. 1, p. 249–259, 2011.

CHANDERBALI, A. S.; VAN DER WERFF, H.; RENNER, S. S. Phylogeny and historical biogeography of Lauraceae: evidence from the chloroplast and nuclear genomes. **Annals of the Missouri Botanical Garden**, v. 88, n. 1, p. 104–134, 2001.

CHANG, A. C. Y.; NUNBERG, J. H.; KAUFMAN, R. J.; ERLICH, H. A.; SCHIMKE, R. T.; COHEN, S. N. Phenotypic expression in *E. coli* of a DNA sequence coding for mouse dihydrofolate reductase. **Nature**, v. 275, n. 5681, p. 617–624, 19 out. 1978.

CHIBAZAKURA, T.; MCGREW, S. G.; COOPER, J. A.; YOSHIKAWA, H.; ROBERTS, J. M. Regulation of cyclin-dependent kinase activity during mitotic exit and maintenance of genome stability by p21, p27, and p107. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 13, p. 4465–70, 30 mar. 2004.

CHOUHAN, G.; ISLAMUDDIN, M.; SAHAL, D.; AFRIN, F. **Exploring the role of medicinal plant-based immunomodulators for effective therapy of leishmaniasis** *Frontiers in Immunology*, 2014. .

CLAYTON, C. E. Gene expression in Kinetoplastids. **Current Opinion in Microbiology**, v. 32, p. 46–51, 2016.

CLEGHORN, L. A. T.; WOODLAND, A.; COLLIE, I. T.; TORRIE, L. S.; NORCROSS, N.; LUKSCH, T.; MPAMHANGA, C.; WALKER, R. G.; MOTTRAM, J. C.; BRENK, R.; FREARSON, J. A.; GILBERT, I. H.; WYATT, P. G. Identification of Inhibitors of the *Leishmania* cdc2-Related Protein Kinase CRK3. **ChemMedChem**, v. 6, p. 2214–2224, 2011.

COGO, J.; KAPLUM, V.; SANGI, D. P.; UEDA-NAKAMURA, T.; CORRÊA, A. G.; NAKAMURA, C. V. Synthesis and biological evaluation of novel 2,3-disubstituted quinoxaline derivatives as antileishmanial and antitrypanosomal agents.

European journal of medicinal chemistry, v. 90, p. 107–23, 27 jan. 2015.

COHEN-FREUE, G.; HOLZER, T. R.; FORNEY, J. D.; MCMASTER, W. R. Global gene expression in *Leishmania*. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1077–1086, 2007.

COHEN, P.; ALESSI, D. R. Kinase drug discovery--what's next in the field? **ACS chemical biology**, v. 8, n. 1, p. 96–104, 2013.

COHEN, S. N.; CHANG, A. C.; BOYER, H. W.; HELLING, R. B. Construction of biologically functional bacterial plasmids *in vitro*. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 70, n. 11, p. 3240–4, nov. 1973.

CONNOR, S. E. O. ALKALOIDS. In: CIVJAN, N. (Ed.). **Natural Products in Chemical Biology**. First Edit ed. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc. 209, 2012. p. 209–237.

COPP, B. R.; PEARCE, a N. Natural product growth inhibitors of *Mycobacterium tuberculosis*. **Natural product reports**, v. 24, n. August 2006, p. 278–297, 2007.

CORDELL, G. A.; QUINN-BEATTIE, M. Lou; FARNSWORTH, N. R. **The potential of alkaloids in drug discovery** *Phytotherapy Research*, 2001.

CORRAL, M. J.; BENITO-PEÑA, E.; JIMENEZ-ANTÓN, M. D.; CUEVAS, L.; MORENO-BONDI, M. C.; ALUNDA, J. M. Allicin Induces Calcium and Mitochondrial Dysregulation Causing Necrotic Death in Leishmania. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 3, p. 1–22, 2016.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission . The vectors , blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, n. October 2014, p. 1–6, 2015.

COURA, J. R.; BORGES-PEREIRA, J. **Chagas disease: 100 years after its discovery. A systemic review***Acta Tropica*, 2010.

COURA, J. R.; DE CASTRO, S. L. **A critical review on chagas disease chemotherapy***Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2002.

COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl, p. 31–40, 2009.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. **Leishmaniasis - Current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs***Trends in Parasitology*, 2003. .
CRUZ, A.; BEVERLEY, S. M. Gene replacement in parasitic protozoa. **Nature**, v. 348, n. 6297, p. 171–3, 8 nov. 1990.

CRUZ, A. K.; TITUS, R.; BEVERLEY, S. M. Plasticity in chromosome number and testing of essential genes in Leishmania by targeting. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 90, n. 4, p. 1599–1603, 1993.

CRUZ, L.; VIVAS, A.; MONTILLA, M.; HERNÁNDEZ, C.; FLÓREZ, C.; PARRA, E.; RAMÍREZ, J. D. Comparative study of the biological properties of Trypanosoma cruzi I genotypes in a murine experimental model. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 29, p. 110–117, 2015.

CULL, B.; PRADO GODINHO, J. L.; FERNANDES RODRIGUES, J. C.; FRANK, B.; SCHURIGT, U.; WILLIAMS, R. A.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Glycosome turnover in Leishmania major is mediated by autophagy. **Autophagy**, v. 10, n. February 2015, p. 2143–2157, 2015.

CUNHA, E. V. L.; BARBOSA FILHO, J. . Alcalóides derivados do núcleo isoquinolinico. In: YUNES, R. A.; CECHINEL FILHO, V. (Ed.). **Química de produtos naturais, novos fármacos e a moderna farmacognosia**. 4. ed. Itajaí: Universidade do Vale do Itajaí, 2014. p. 279–319.

CUSHNIE, T. P. T.; CUSHNIE, B.; LAMB, A. J. Alkaloids: An overview of their antibacterial, antibiotic-enhancing and antivirulence activities. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 44, n. 5, p. 377–386, 2014.

CUSTÓTIDO, D.; DA VEIGA-JUNIOR, V. F. Lauraceae alkaloids. **RSC Advances**, n. 42, p. 21864–21890, 2014.

DA SILVA, M. S.; MONTEIRO, J. P.; NUNES, V. S.; VASCONCELOS, E. J.; PEREZ, A. M.; FREITAS, L. D. H.; ELIAS, M. C.; CANO, M. I. N. Leishmania amazonensis promastigotes present two distinct modes of nucleus and kinetoplast segregation during cell cycle. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, p. 1–12, 2013.

DAI, K.; YUAN, G.; LIAO, S.; ZHANG, J.; TU, X. ¹H, ¹³C and ¹⁵N resonance assignments for a putative ADF/Cofilin from Trypanosoma brucei. **Biomolecular NMR Assignments**, v. 5, n. 2, p. 249–251, 2011.

DANTAS, A. P.; BARBOSA, H. S.; DE CASTRO, S. L. Biological and ultrastructural effects of the anti-microtubule agent taxol against Trypanosoma cruzi. **Journal of submicroscopic cytology and pathology**, v. 35, p. 287–294, 2003.

DAVANLOO, P.; ROSENBERG, A. H.; DUNN, J. J.; STUDIER, F. W. Cloning and expression of the gene for bacteriophage T7 RNA polymerase. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 81, n. 7, p. 2035–2039, 1984.

DE LICHTENBERG, U.; JENSEN, T. S.; BRUNAK, S.; BORK, P.; JENSEN, L. J. Evolution of cell cycle control: same molecular machines, different regulation. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 6, n. 15, p. 1819–25, 1 ago. 2007.

DE MACEDO-SILVA, S. T.; URBINA, J. A.; DE SOUZA, W.; RODRIGUES, J. C. F. *In vitro* activity of the antifungal azoles itraconazole and posaconazole against Leishmania amazonensis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 12, 2013.

DE PABLOS, L. M.; FERREIRA, T. R.; WALRAD, P. B. Developmental differentiation in Leishmania lifecycle progression: post-transcriptional control conducts the orchestra. **Current Opinion in Microbiology**, v. 34, n. Figure 1, p. 82–89, 2016.

DE SOUZA, W. Doenças negligenciadas. **Academia Brasileira de Ciências - Doenças Negligenciadas**, p. 56, 2010.

DE SOUZA, W. . Structural organization of Trypanosoma cruzi. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. May, p. 89–100, 2009.

DEMICHELI, C.; FRÉZARD, F.; LECOUEY, M.; GARNIER-SUILLEROT, A. Antimony(V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1570, p. 192–198, 2002

DENISE, H.; MCNEIL, K.; BROOKS, D. R.; ALEXANDER, J.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Expression of Multiple CPB Genes Encoding Cysteine Proteases Is Required for *Leishmania mexicana* Virulence *In vivo*. v. 71, n. 6, p. 3190–3195, 2003.

DEWICK, P. M. **Medicinal Natural Products: a biosynthetic approach**. 2nd ed ed. West Sussex: John Wiley & Sons Ltd, 2002.

DIAS, J. C. P.; PRATA, A.; CORREIA, D. **Problems and perspectives for Chagas disease control: In search of a realistic analysis** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, 2008.

DILLON, L. A. L.; OKRAH, K.; HUGHITT, K. V.; SURESH, R.; LI, Y.; FERNANDES, M. C.; BELEW, A. T.; BRAVO, H. C.; MOSSER, D. M.; EL-SAYED, N. M. Transcriptomic profiling of gene expression and RNA processing during *Leishmania major* differentiation. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. 14, p. 6799–6813, 2015.

DOEHL, J. S. P.; SÁDLOVÁ, J.; ASLAN, H.; PRUŽINOVÁ, K.; METANGMO, S.; VOTÝPKA, J.; KAMHAWI, S.; VOLF, P.; SMITH, D. F. *Leishmania* HASP and SHERP Genes Are Required for *In vivo* Differentiation, Parasite Transmission and Virulence Attenuation in the Host. **PLOS Pathogens**, v. 13, n. 1, p. e1006130, 2017.

DORÉE, M.; HUNT, T. From Cdc2 to Cdk1: when did the cell cycle kinase join its cyclin partner? **Journal of cell science**, v. 115, n. Pt 12, p. 2461–4, 15 jun. 2002.

DORTAY, H.; MUELLER-ROEBER, B. A highly efficient pipeline for protein expression in *Leishmania tarentolae* using infrared fluorescence protein as marker. **Microbial cell factories**, v. 9, p. 29, 2010.

DRUKER, B. J. Imatinib as a paradigm of targeted therapies. **Advances in cancer research**, v. 91, p. 1–30, 2004.

DUNCAN, S. M.; MYBURGH, E.; PHILIPON, C.; BROWN, E.; MEISSNER, M.; BREWER, J.; MOTTRAM, J. C. Conditional gene deletion with DiCre demonstrates an essential role for CRK3 in *Leishmania mexicana* cell cycle regulation. **Molecular Microbiology**, v. 100, n. 6, p. 931–944, jun. 2016.

DURIEU, E.; PRINA, E.; LECLERCQ, O.; OUMATA, N.; GABORIAUD-KOLAR, N.; VOUGOGIANNPOULOU, K.; AULNER, N.; DEFONTAINE, A.; NO, J. H.; RUCHAUD, S.; SKALTSOUNIS, A. L.; GALONS, H.; SPÄTH, G. F.; MEIJER, L.; RACHIDI, N. From drug screening to target deconvolution: A target-based drug discovery pipeline using *Leishmania* casein kinase 1 isoform 2 to identify compounds with antileishmanial activity. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 5, p. 2822–2833, 2016.

EHRENWORTH, A. M.; PERALTA-YAHYA, P. Accelerating the semisynthesis of alkaloid-based drugs through metabolic engineering. **Nature Chemical Biology**, v. 13, n. 3, p. 249–258, 2017.

EL-SAYED, M.; VERPOORTE, R. Catharanthus terpenoid indole alkaloids: biosynthesis and regulation. **Phytochemistry Reviews**, v. 6, n. 2–3, p. 277–305, 1 jun. 2007.

ELAMIN, M. H.; SHINWARI, Z.; HENDRAYANI, S.-F.; AL-HINDI, H.; AL-SHAIL, E.; KHAFAGA, Y.; AL-KOFIDE, A.; ABOUSSEKHRA, A. Curcumin inhibits the Sonic Hedgehog signaling pathway and triggers apoptosis in medulloblastoma cells. **Molecular carcinogenesis**, v. 49, n. 3, p. 302–314, 2010.

ELIAS, M. C.; DA CUNHA, J. P. C.; DE FARIA, F. P.; MORTARA, R. A.; FREYMÜLLER, E.; SCHENKMAN, S. Morphological Events during the Trypanosoma cruzi Cell Cycle. **Protist**, v. 158, n. 2, p. 147–157, 2007.

ERBEN, E. D.; FADDA, A.; LUEONG, S.; HOHEISEL, J. D.; CLAYTON, C. A Genome-Wide Tethering Screen Reveals Novel Potential Post-Transcriptional Regulators in Trypanosoma brucei. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 6, 2014.

ESCH, K. J.; PETERSEN, C. A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 58–85, 2013.

EVANS, J. C.; MIZRAHI, V. The application of tetracyclineregulated gene expression systems in the validation of novel drug targets in Mycobacterium tuberculosis. **Frontiers in Microbiology**, v. 6, n. AUG, p. 1–14, 2015.

FARIA, M. S.; REIS, F. C. G.; AZEVEDO-PEREIRA, R. L.; MORRISON, L. S.; MOTTRAM, J. C.; LIMA, A. P. C. A. Leishmania inhibitor of serine peptidase 2 prevents TLR4 activation by neutrophil elastase promoting parasite survival in murine macrophages. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 186, n. 1, p. 411–22, 1 jan. 2011.

FARINA, M.; ATTIAS, M.; SOUTO-PADRÓN, T.; DE SOUZA, W. Further Studies on the Organization of the Paraxial Rod of Trypanosomatids. **J. Protozool.**, v. 33, n. 4, p. 552–557, 1986.

FIEBIG, M.; KELLY, S.; GLUENZ, E. Comparative Life Cycle Transcriptomics Revises *Leishmania mexicana* Genome Annotation and Links a Chromosome Duplication with Parasitism of Vertebrates. **PLoS Pathogens**, v. 11, n. 10, p. 1–28, 2015.

FIELD, M. C.; HORN, D.; FAIRLAMB, A. H.; FERGUSON, M. A. J.; GRAY, D. W.; READ, K. D.; DE RYCKER, M.; TORRIE, L. S.; WYATT, P. G.; WYLLIE, S.; GILBERT, I. H. Anti-trypanosomatid drug discovery: an ongoing challenge and a continuing need. **Nature Reviews Microbiology**, 2017.

FONSECA-SILVA, F.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; MENNA-BARRETO, R. F. S.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. Effect of Apigenin on *Leishmania amazonensis* Is Associated with Reactive Oxygen Species Production Followed by Mitochondrial Dysfunction. **Journal of Natural Products**, p. 150313142049006, 2015.

FONSECA-SILVA, F.; INACIO, J. D. F.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. **PLoS ONE**, v. 6, 2011.

FOURNET, A.; BARRIOS, A. A.; MUÑOZ, V. Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 41, p. 19–37, 1994.

FOURNET, A.; FERREIRA, M. E.; ROJAS DE ARIAS, A.; GUY, I.; GUINAUDEAU, H.; HEINZEN, H. Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia*. **Fitoterapia**, v. 78, p. 382–384, 2007.

FOURNET, A.; MUÑOZ, V.; ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R.; CAVÉ, A.; GANTIER, J.-C. Antiprotozoal activity of dehydrozaluzanin C, a sesquiterpene lactone isolated from *Munnozia maronii* (asteraceae). **Phytotherapy Research**, v. 7, p. 111–115, 1993.

FREITAS-JUNIOR, L. H.; CHATELAIN, E.; KIM, H. A.; SIQUEIRA-NETO, J. L. **Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it?** **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**, 2012. .

GALLUZZI, L.; BRAVO-SAN PEDRO, J. M.; VITALE, I.; AARONSON, S. a; ABRAMS, J. M.; ADAM, D.; ALNEMRI, E. S.; ALTUCCI, L.; ANDREWS, D.; ANNICCHIARICO-PETRUZZELLI, M.; BAEHRECKE, E. H.; BAZAN, N. G.; BERTRAND, M. J.; BIANCHI, K.; BLAGOSKLONNY, M. V; BLOMGREN, K.; BORNER, C.; BREDESEN, D. E.; BRENNER, C.; CAMPANELLA, M.; CANDI, E.; CECCONI, F.; CHAN, F. K.; CHANDEL, N. S.; CHENG, E. H.; CHIPUK, J. E.; CIDLOWSKI, J. a; CIECHANOVER, a; DAWSON, T. M.; DAWSON, V. L.; DE LAURENZI, V.; DE MARIA, R.; DEBATIN, K.-M.; DI DANIELE, N.; DIXIT, V. M.; DYNLACHT, B. D.; EL-DEIRY, W. S.; FIMIA, G. M.; FLAVELL, R. a; FULDA, S.; GARRIDO, C.; GOUGEON, M.-L.; GREEN, D. R.; GRONEMEYER, H.; HAJNOCZKY, G.; HARDWICK, J. M.; HENGARTNER, M. O.; ICHIJO, H.; JOSEPH, B.; JOST, P. J.; KAUFMANN, T.; KEPP, O.; KLIONSKY, D. J.; KNIGHT, R. a; KUMAR, S.; LEMASTERS, J. J.; LEVINE, B.; LINKERMANN, a; LIPTON, S. a; LOCKSHIN, R. a; LÓPEZ-OTÍN, C.; LUGLI, E.; MADEO, F.; MALORNI, W.; MARINE, J.-C.; MARTIN, S. J.; MARTINOU, J.-C.; MEDEMA, J. P.; MEIER, P.; MELINO, S.; MIZUSHIMA, N.; MOLL, U.; MUÑOZ-PINEDO, C.; NUÑEZ, G.; OBERST, a; PANARETAKIS, T.; PENNINGER, J. M.; PETER, M. E.; PIACENTINI, M.; PINTON, P.; PREHN, J. H.; PUTHALAKATH, H.; RABINOVICH, G. a; RAVICHANDRAN, K. S.; RIZZUTO, R.; RODRIGUES, C. M.; RUBINSZTEIN, D. C.; RUDEL, T.; SHI, Y.; SIMON, H.-U.; STOCKWELL, B. R.;

SZABADKAI, G.; TAIT, S. W.; TANG, H. L.; TAVERNARAKIS, N.; TSUJIMOTO, Y.; VANDEN BERGHE, T.; VANDENABEELE, P.; VILLUNGER, a; WAGNER, E. F.; WALCZAK, H.; WHITE, E.; WOOD, W. G.; YUAN, J.; ZAKERI, Z.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G.; KROEMER, G. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD 2015. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, n. 1, p. 58–73, 2014.

GARCEZ, F. R.; FRANCISCA DA SILVA, A. G.; GARCEZ, W. S.; LINCK, G.; DE FATIMA MATOS, M. C.; SANTOS, E. C. S.; QUEIROZ, L. M. M. Cytotoxic aporphine alkaloids from *ocotea acutifolia*. **Planta Medica**, v. 77, p. 383–387, 2011.

GASSER, R. A.; MAGILL, A. J.; OSTER, C. N.; FRANKE, E. D.; GROGL, M.; BERMAN, J. D. Pancreatitis Induced by Pentavalent Antimonial Agents During Treatment of Leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, v. 18, p. 83–90, 1994. GHERBOVET, O.; CODERCH, C.; GARCÍA ALVAREZ, M. C.; BIGNON, J.; THORET, S.; GUÉRITTE, F.; GAGO, F.; ROUSSI, F. One-pot synthesis of vinca alkaloids-phomopsin hybrids. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 57, n. 12, p. 5470–5476, 2014.

GIBSON, D. G.; YOUNG, L.; CHUANG, R.-Y.; VENTER, J. C.; HUTCHISON, C. a; SMITH, H. O.; III, C. A. H.; AMERICA, N. Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. **Nature methods**, v. 6, n. 5, p. 343–5, 2009. GIOVANNINI, C.; MATARRESE, P.; SCAZZOCCHIO, B.; SANCHEZ, M.; MASELLA, R.; MALORNI, W. Mitochondria hyperpolarization is an early event in oxidized low-density lipoprotein-induced apoptosis in Caco-2 intestinal cells. **FEBS Letters**, v. 523, p. 200–206, 2002.

GLUENZ, E.; HÖÖG, J. L.; SMITH, A. E.; DAWE, H. R.; SHAW, M. K.; GULL, K. Beyond 9+0: noncanonical axoneme structures characterize sensory cilia from protists to humans. **The FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 24, n. 9, p. 3117–3121, 2010.

GOMES, A. R.; BYREGOWDA, S. M.; VEEREGOWDA, B. M.; BALAMURUGAN, V. An Overview of Heterologous Expression Host Systems for the Production of Recombinant Proteins. **Advances in Animal and Veterinary Sciences**, v. 4, n. 7, p. 346–356, jun. 2016.

GOMES, F. C.; ALI, N. O. M.; BROWN, E.; WALKER, R. G.; KAREN, M.; MOTTRAM, J. C. Recombinant *Leishmania mexicana* CRK3:CYCA has protein kinase activity in the absence of phosphorylation on the T-loop residue Thr178. v. 171, n. 2, p. 89–96, 2010.

GONCALVES, N. B.; CORREA, J. C.; GOTTLIEB, O. R. Analeptic action of anibine. **Nature**, v. 182, n. 4640, p. 938–939, 1958.

GONÇALVES, R. L. S.; MENNA BARRETO, R. F. S.; POLYCARPO, C. R.; GADELHA, F. R.; CASTRO, S. L.; OLIVEIRA, M. F. A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 43, p. 651–661, 2011.

GOSSEN, M.; BUJARD, H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline-responsive promoters. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 12, p. 5547–51, 1992.

GOSSEN, M.; FREUNDLIEB, S.; BENDER, G.; MÜLLER, G.; HILLEN, W.; BUJARD, H. Transcriptional activation by tetracyclines in mammalian cells. **Science**, v. 268, n. 5218, p. 1766–1769, 1995.

GOTTLIEB, O. R. CHEMOSYSTEMATICS OF THE LAURACEAE. **Phytoc**, v. 11, p. 1537–1573, 1972a.

GOTTLIEB, O. R. **Chemosystematics of the lauraceae** **Phytochemistry**, 1972b.

GOURGUECHON, S.; SAVICH, J. M.; WANG, C. C. The multiple roles of cyclin E1 in controlling cell cycle progression and cellular morphology of *Trypanosoma brucei*. **J Mol Biol.**, v. 368, n. 4, p. 939–950, 2007.

GOUVEA, D. R.; GOBBO-NETO, L.; SAKAMOTO, H. T.; LOPES, N. P.; LOPES, J. L. C.; MELONI, F.; AMARAL, J. G. Seasonal variation of the major secondary metabolites present in the extract of *eremanthus mattogrossensis* less (asteraceae: Vernoniaeae) leaves. **Quimica Nova**, v. 35, p. 2139–2145, 2012.

GRANT, K. M. Targeting the Cell Cycle in the Pursuit of Novel Chemotherapies Against Parasitic Protozoa. p. 917–924, 2008.

GRANT, K. M.; DUNION, M. H.; YARDLEY, V.; SKALTSOUNIS, A.; MARKO, D.; EISENBRAND, G.; CROFT, S. L.; MEIJER, L.; MOTTRAM, J. C. Inhibitors of *Leishmania mexicana* CRK3 Cyclin-Dependent Kinase : Chemical Library Screen and Antileishmanial Activity. v. 48, n. 8, p. 3033–3042, 2004.

GRANT, K. M.; HASSAN, P.; ANDERSON, J. S.; MOTTRAM, J. C. The crk3 Gene of *Leishmania mexicana* Encodes a Stage-Regulated cdc2-Related Histone H1 Kinase That Associates with p12. **The Journal of biological chemistry**, v. 273, n. 17, p. 10153–10159, abr. 1998.

GRECCO, S. S.; LORENZI, H.; TEMPONE, A. G.; LAGO, J. H. G. Update: biological and chemical aspects of *Nectandra* genus (Lauraceae). **Tetrahedron: Asymmetry**, v. 27, n. 17–18, p. 793–810, out. 2016.

GRELLIER, P.; SINOUE, V.; GARREAU-DE LOUBRESSE, N.; BYLÈN, E.; BOULARD, Y.; SCHRÉVEL, J. Selective and reversible effects of vinca alkaloids on *trypanosoma cruzi* epimastigote forms: Blockage of cytokinesis without inhibition of the organelle duplication. **Cell Motility and the Cytoskeleton**, v. 42, n. June 1998, p. 36–47, 1999.

GROSS, S.; RAHAL, R.; STRANSKY, N.; LENGAUER, C.; HOEFLICH, K. P. Targeting cancer with kinase inhibitors. **Journal of Clinical Investigation**, v. 125, n. 5, p. 1780–1789, 1 maio 2015.

GUEDES-DA-SILVA, F. H.; BATISTA, D. G. J.; MEUSER, M. B.; DEMARQUE, K. C.; FULCO, T. O.; ARA??JO, J. S.; DA SILVA, P. B.; DA SILVA, C. F.; PATRICK, D. A.; BAKUNOVA, S. M.; BAKUNOV, S. A.; TIDWELL, R. R.; OLIVEIRA, G. M.; BRITTO, C.; MOREIRA, O. C.; SOEIRO, M. N. C. *In vitro* and *in vivo* trypanosomicidal action of novel arylimidamides against trypanosoma cruzi. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 4, p. 2425–2434, 2016.

HAMID, H. A.; RAMLI, A. N. M.; YUSOFF, M. M. Indole Alkaloids from Plants as Potential Leads for Antidepressant Drugs: A Mini Review. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. February, p. 96, 2017.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–74, 4 mar. 2011.

HANS, G.; MALGRANGE, B.; LALLEMEND, F.; CROMMEN, J.; WISLET-GENDEBIEN, S.; BELACHEW, S.; ROBE, P.; ROGISTER, B.; MOONEN, G.; RIGO, J.-M. Beta-carbolines induce apoptosis in cultured cerebellar granule neurons via the mitochondrial pathway. **Neuropharmacology**, v. 48, p. 105–117, 2005.

HARASHIMA, H.; DISSMEYER, N.; SCHNITTGER, A. Cell cycle control across the eukaryotic kingdom. **Trends in Cell Biology**, v. 23, n. 7, p. 345–356, 2013.
HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111–129, 2015.

HASSAN, P.; FERGUSSON, D.; GRANT, K. M.; MOTTRAM, J. C. The CRK3 protein kinase is essential for cell cycle progression of *Leishmania mexicana*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 113, n. 2, p. 189–98, 6 abr. 2001.
HAVENS, C. G.; BRYANT, N.; ASHER, L.; LAMOREAUX, L.; PERFETTO, S.; BRENDLE, J. J.; WERBOVETZ, K. A. Cellular effects of leishmanial tubulin inhibitors on *L. donovani*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 110, p. 223–236, 2000.

HE, C. Y.; HO, H. H.; MALSAM, J.; CHALOUNI, C.; WEST, C. M.; ULLU, E.; TOOMRE, D.; WARREN, G. Golgi Duplication in Trypanosoma Brucei. **The Journal of cell biology**, v. 165, n. 3, p. 313–321, maio 2004.
HYDBRING, P.; MALUMBRES, M.; SICINSKI, P. Non-canonical functions of cell cycle cyclins and cyclin-dependent kinases. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 17, n. 5, p. 280–292, 2016.

INBAR, E.; AKOPYANTS, N. S.; CHARMOY, M.; ROMANO, A.; LAWYER, P.; ELNAIEM, D.-E. A.; KAUFFMANN, F.; BARHOUMI, M.; GRIGG, M.; OWENS, K.; FAY, M.; DOBSON, D. E.; SHAIK, J.; BEVERLEY, S. M.; SACKS, D. The mating competence of geographically diverse *Leishmania* major strains in their natural and unnatural sand fly vectors. **PLoS genetics**, v. 9, n. 7, p. e1003672, 2013.

ISHEMGULOVA, A.; KRAEVA, N.; FAKTOROVA, D.; PODESVOVA, L.; LUKES, J.; YURCHENKO, V. T7 polymerase-driven transcription is downregulated in metacyclic promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*. **Folia Parasitologica**, v. 63, 18 maio 2016.

IVENS, A. C.; PEACOCK, C. S.; WORTHEY, E. A.; MURPHY, L.; AGGARWAL, G.; BERRIMAN, M.; SISK, E.; RAJANDREAM, M.-A.; ADLEM, E.; AERT, R.; ANUPAMA, A.; APOSTOLOU, Z.; ATTIPOE, P.; BASON, N.; BAUSER, C.; BECK, A.; BEVERLEY, S. M.; BIANCHETTIN, G.; BORZYM, K.; BOTHE, G.; BRUSCHI, C. V.; COLLINS, M.; CADAG, E.; CIARLONI, L.; CLAYTON, C.; COULSON, R. M. R.; CRONIN, A.; CRUZ, A. K.; DAVIES, R. M.; DE GAUDENZI, J.; DOBSON, D. E.; DUESTERHOEFT, A.; FAZELINA, G.; FOSKER, N.; FRASCH, A. C.; FRASER, A.; FUCHS, M.; GABEL, C.; GOBLE, A.; GOFFEAU, A.; HARRIS, D.; HERTZ-FOWLER, C.; HILBERT, H.; HORN, D.; HUANG, Y.; KLAGES, S.; KNIGHTS, A.; KUBE, M.; LARKE, N.; LITVIN, L.; LORD, A.; LOUIE, T.; MARRA, M.; MASUY, D.; MATTHEWS, K.; MICHAELI, S.; MOTTRAM, J. C.; MÜLLER-AUER, S.; MUNDEN, H.; NELSON, S.; NORBERTCZAK, H.; OLIVER, K.; O'NEIL, S.; PENTONY, M.; POHL, T. M.; PRICE, C.; PURNELLE, B.; QUAIL, M. A.; RABBINOWITSCH, E.; REINHARDT, R.; RIEGER, M.; RINTA, J.; ROBBEN, J.; ROBERTSON, L.; RUIZ, J. C.; RUTTER, S.; SAUNDERS, D.; SCHÄFER, M.; SCHEIN, J.; SCHWARTZ, D. C.; SEEGER, K.; SEYLER, A.; SHARP, S.; SHIN, H.; SIVAM, D.; SQUARES, R.; SQUARES, S.; TOSATO, V.; VOGT, C.; VOLCKAERT, G.; WAMBUTT, R.; WARREN, T.; WEDLER, H.; WOODWARD, J.; ZHOU, S.; ZIMMERMANN, W.; SMITH, D. F.; BLACKWELL, J. M.; STUART, K. D.; BARRELL, B.; MYLER, P. J. The genome of the kinetoplastid parasite, *Leishmania major*. **Science (New York, N.Y.)**, v. 309, n. 5733, p. 436–42, 15 jul. 2005.

IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; VEIGA JÚNIOR, V. F.; NAKAMURA, C. V. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. **Natural product reports**, v. 28, n. 4, p. 809–23, abr. 2011.

JACOBS, R. T.; NARE, B.; WRING, S. A.; ORR, M. D.; CHEN, D.; SLIGAR, J. M.; JENKS, M. X.; NOE, R. A.; BOWLING, T. S.; MERCER, L. T.; REWERTS, C.; GAUKEL, E.; OWENS, J.; PARHAM, R.; RANDOLPH, R.; BEAUDET, B.; BACCHI, C. J.; YARLETT, N.; PLATTNER, J. J.; FREUND, Y.; DING, C.; AKAMA, T.; ZHANG, Y.-K.; BRUN, R.; KAISER, M.; SCANDALE, I.; DON, R. SCYX-7158, an Orally-Active Benzoxaborole for the Treatment of Stage 2 Human African Trypanosomiasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, n. 6, p. e1151, 28 jun. 2011.

JACOBUS, A. P.; GROSS, J. Optimal Cloning of PCR Fragments by Homologous Recombination in *Escherichia coli*. **PLOS ONE**, v. 10, n. 3, p. e0119221, 16 mar. 2015.

JIMÉNEZ-RUIZ, A.; ALZATE, J. F.; MACLEOD, E. T.; LÜDER, C. G. K.; FASEL, N.; HURD, H. Apoptotic markers in protozoan parasites. **Parasites & vectors**, v. 3, n. 1, p. 104, jan. 2010.

JIMENEZ, V.; PAREDES, R.; SOSA, M. A.; GALANTI, N. Natural programmed cell death in *T. cruzi* epimastigotes maintained in axenic cultures. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 105, p. 688–698, 2008.

JONES, N. G.; THOMAS, E. B.; BROWN, E.; DICKENS, N. J.; HAMMARTON, T. C.; MOTTRAM, J. C. Regulators of *Trypanosoma brucei* Cell Cycle Progression and Differentiation Identified Using a Kinome-Wide RNAi Screen. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 1, 2014.

JORDAN, M. A.; WILSON, L. Microtubules as a target for anticancer drugs. **Nature reviews. Cancer**, v. 4, n. 4, p. 253–265, 2004.

JUNQUEIRA, C.; CAETANO, B.; BARTHOLOMEU, D. C.; MELO, M. B.; ROPERT, C.; RODRIGUES, M. M.; GAZZINELLI, R. T. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert reviews in molecular medicine**, v. 12, p. e29, 2010.

KAPIL, A. Piperine: A potent inhibitor of *Leishmania donovani* promastigotes *in vitro*. **Planta Medica**, v. 59, p. 474, 1993.

KAPLUM, V.; COGO, J.; SANGI, P.; UEDA-NAKAMURA, T.; CORRÊA, G.; NAKAMURA, V. *In vitro* and *In vivo* Activities of 2,3-Diarylsubstituted Quinoxaline Derivatives against *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 60, n. 6, p. 3433–3444, 2016.

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

KECK, J. M.; SUMMERS, M. K.; TEDESCO, D.; EKHOLM-REED, S.; CHUANG, L.-C.; JACKSON, P. K.; REED, S. I. Cyclin E overexpression impairs progression through mitosis by inhibiting APC Cdh1. **The Journal of Cell Biology**, v. 178, n. 3, p. 371–385, 30 jul. 2007.

KHARE, S.; NAGLE, A. S.; BIGGART, A.; LAI, Y. H.; LIANG, F.; DAVIS, L. C.; BARNES, S. W.; MATHISON, C. J. N.; MYBURGH, E.; GAO, M.-Y.; GILLESPIE, J. R.; LIU, X.; TAN, J. L.; STINSON, M.; RIVERA, I. C.; BALLARD, J.; YEH, V.; GROESSL, T.; FEDERE, G.; KOH, H. X. Y.; VENABLE, J. D.; BURSULAYA, B.; SHAPIRO, M.; MISHRA, P. K.; SPRAGGON, G.; BROCK, A.; MOTTRAM, J. C.; BUCKNER, F. S.; RAO, S. P. S.; WEN, B. G.; WALKER, J. R.; TUNTLAND, T.; MOLTENI, V.; GLYNNE, R. J.; SUPEK, F. Proteasome inhibition for treatment of leishmaniasis, Chagas disease and sleeping sickness. **Nature**, p. 1–24, 2016.

KHOURY, G. A.; BALIBAN, R. C.; FLOUDAS, C. A. Proteome-wide post-translational modification statistics: frequency analysis and curation of the swiss-prot database. **Scientific Reports**, v. 1, p. 90, 13 set. 2011.

KIM, J.-S.; NAKAGAWA, A.; YAMAZAKI, Y.; MATSUMURA, E.; KOYANAGI, T.; MINAMI, H.; KATAYAMA, T.; SATO, F.; KUMAGAI, H. Improvement of Reticuline Productivity from Dopamine by Using Engineered *Escherichia coli*. **Bioscience, Biotechnology and Biochemistry**, v. 77, n. 10, p. 2166–2168, 2014

KINGSTON, D. G. I.; NEWMAN, D. J. Natural products as anticancer agents. In: CIVJAN, N. (Ed.). **Natural Products in Chemical Biology, First Edition. Edited by Natanya Civjan**. First Edit ed. [s.l.] John Wiley & Sons, Inc, 2012. p. 325–349.

KRAEVA, N.; ISHEMGULOVA, A.; LUKEŠ, J.; YURCHENKO, V. Tetracycline-inducible gene expression system in *Leishmania mexicana*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 198, n. 1, p. 11–13, 2014.

KROEMER, G.; GALLUZZI, L.; VANDENABEELE, P.; ABRAMS, J.; ALNEMRI, E. S.; BAEHRECKE, E. H.; BLAGOSKLONNY, M. V; EL-DEIRY, W. S.; GOLSTEIN, P.; GREEN, D. R.; HENGARTNER, M.; KNIGHT, R. A.; KUMAR, S.; LIPTON, S. A.; MALORNI, W.; NUÑEZ, G.; PETER, M. E.; TSCHOPP, J.; YUAN, J.; PIACENTINI, M.; ZHIVOTOVSKY, B.; MELINO, G. Classification of cell death: recommendations of the Nomenclature Committee on Cell Death 2009. **Cell death and differentiation**, v. 16, n. 1, p. 3–11, 2009.

KUO, R.-Y.; QIAN, K.; MORRIS-NATSCHKE, S. L.; LEE, K.-H. Plant-derived triterpenoids and analogues as antitumor and anti-HIV agents. **Natural product reports**, v. 26, p. 1321–1344, 2009.

KUSHNIR, S.; GASE, K.; BREITLING, R.; ALEXANDROV, K. Development of an inducible protein expression system based on the protozoan host *Leishmania tarentolae*. **Protein Expression and Purification**, v. 42, n. 1, p. 37–46, 2005.

KUTCHAN, T. M. Heterologous expression of alkaloid biosynthetic genes — a review. **Gene**, v. 179, n. 1, p. 73–81, jan. 1996.

KYRIAZIS, J. D.; ALIGIANNIS, N.; POLYCHRONOPOULOS, P.; SKALTSOUNIS, A. L.; DOTSIKA, E. Leishmanicidal activity assessment of olive tree extracts. **Phytomedicine**, v. 20, p. 275–281, 2013.

LA FLAMME, A. C.; BUCKNER, F. S.; SWINDLE, J.; AJIOKA, J.; VAN VOORHIS, W. C. Expression of mammalian cytokines by *Trypanosoma cruzi* indicates unique signal sequence requirements and processing. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 75, n. 1, p. 25–31, dez. 1995.

LAMBERTZ, C.; GARVEY, M.; KLINGER, J.; HEESEL, D.; KLOSE, H.; FISCHER, R.; COMMANDEUR, U. Challenges and advances in the heterologous expression of cellulolytic enzymes: a review. **Biotechnology for Biofuels**, v. 7, n. 1, p. 1–15, 2014.

LAZARIN-BIDÓIA, D.; DESOTI, V. C.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; NAKAMURA, C. V; SILVA, S. O. Further evidence of the trypanocidal action of eupomatenoid-5: confirmation of involvement of reactive oxygen species and mitochondria owing to a reduction in trypanothione reductase activity. **Free radical biology & medicine**, v. 60, p. 17–28, jul. 2013.

LIU, B.; LIU, Y.; MOTYKA, S. A.; AGBO, E. E. C.; ENGLUND, P. T. Fellowship of the rings: The replication of kinetoplast DNA. **Trends in Parasitology**, v. 21, n. 8, p. 363–369, 2005.

LIU, L.; ZHANG, K.; SANDOVAL, H.; YAMAMOTO, S.; JAISWAL, M.; SANZ, E.; LI, Z.; HUI, J.; GRAHAM, B. H.; QUINTANA, A.; BELLEN, H. J. Article Glial Lipid Droplets and ROS Induced by Mitochondrial Defects Promote Neurodegeneration. **Cell**, v. 160, n. 1–2, p. 177–190, 2015.

LOEW, R.; HEINZ, N.; HAMPF, M.; BUJARD, H.; GOSSEN, M. Improved Tet-responsive promoters with minimized background expression. **BMC biotechnology**, v. 10, n. 1, p. 81, 2010.

LOSIEWICZ, M. D.; CARLSON, B. A.; KAUR, G.; SAUSVILLE, E. A.; WORLAND, P. J. Potent inhibition of CDC2 kinase activity by the flavonoid L86-8275. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 201, n. 2, p. 589–95, 15 jun. 1994.

MACEDO, A. M.; PIMENTA, J. R.; DE AGUIAR, R. S.; MELO, A. I. R.; CHIARI, E.; ZINGALES, B.; PENA, S. D. J.; OLIVEIRA, R. P. Usefulness of Microsatellite Typing in Population Genetic Studies of *Trypanosoma cruzi*. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 96, p. 407–413, 2001.

MAITY, A. K.; GOSWAMI, A.; SAHA, P. Identification of substrates of an S-phase cell cycle kinase from *Leishmania donovani*. **FEBS Letters**, v. 585, n. 17, p. 2635–2639, 2011.

MALUMBRES, M.; BARBACID, M. Mammalian cyclin-dependent kinases. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 30, n. 11, p. 630–641, 2005.

MARINHO, F. D. A.; GONÇALVES, K. C. D. S.; DE OLIVEIRA, S. S.; DE OLIVEIRA, A.-C. D. S. C.; BELLIO, M.; D'AVILA-LEVY, C. M.; DOS SANTOS, A. L. S.; BRANQUINHA, M. H. Miltefosine induces programmed cell death in *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 106, n. 4, p. 507–9, jun. 2011.

MARQUES, C. A. Importância Econômica da Família Lauraceae. **Floresta e Ambiente**, v. 8, p. 195–206, 2001.

MARZO, A.; GHIRARDI, P.; CASAGRANDE, C.; CATENAZZO, G.; MANTERO, O. Preliminary data on the pharmacokinetics of Glaziovine in man. **European Journal of Clinical Pharmacology**, v. 13, n. 3, p. 219–222, 1978.

MATOUSSI, N.; AMEUR, H. B.; AMOR, S. B.; FITOURI, Z.; BECHER, S. B. Cardiotoxicity of n-methyl-glucamine antimoniate (Glucantime®). A case report. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 37, 2007.

MAYA, J. D.; CASSELS, B. K.; ITURRIAGA-VÁSQUEZ, P.; FERREIRA, J.; FAÚNDEZ, M.; GALANTI, N.; FERREIRA, A.; MORELLO, A. Mode of action of natural and synthetic drugs against *Trypanosoma cruzi* and their interaction with the mammalian host. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 146, p. 601–620, 2007.

MAYA, J. D.; ORELLANA, M.; FERREIRA, J.; KEMMERLING, U.; LÓPEZ-MUÑOZ, R.; MORELLO, A. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. **Biological Research**, v. 43, p. 323–331, 2010.

MEDEIROS, M. A. A.; NUNES, X. P.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LEMOS, V. S.; PINHO, J. F.; ROMAN-CAMPOS, D.; DE MEDEIROS, I. A.; ARAÚJO, D. A. M.; CRUZ, J. S. (S)-reticuline induces vasorelaxation through the blockade of L-type Ca²⁺ channels. **Naunyn-Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, v. 379, n. 2, p. 115–125, 2009.

MEIJER, L.; BORGNE, A.; MULNER, O.; CHONG, J. P.; BLOW, J. J.; INAGAKI, N.; INAGAKI, M.; DELCROS, J. G.; MOULINOUX, J. P. Biochemical and cellular effects of roscovitine, a potent and selective inhibitor of the cyclin-dependent kinases cdc2, cdk2 and cdk5. **European journal of biochemistry**, v. 243, n. 1–2, p. 527–36, 15 jan. 1997.

MENNA-BARRETO, R.; DE CASTRO, S. L. **The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: The pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics** *BioMed Research International* Hindawi Publishing Corporation, , 2014.

MENNA-BARRETO, R. F. S.; HENRIQUES-PONS, A.; PINTO, A. V; MORGADO-DIAZ, J. a; SOARES, M. J.; DE CASTRO, S. L. Effect of a beta-lapachone-derived naphthoimidazole on *Trypanosoma cruzi*: identification of target organelles. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 56, n. November, p. 1034–1041, 2005.

MENNA-BARRETO, R. F. S.; LARANJA, G. a T.; SILVA, M. C. C.; COELHO, M. G. P.; PAES, M. C.; OLIVEIRA, M. M.; DE CASTRO, S. L. Anti-*Trypanosoma cruzi* activity of *Pterodon pubescens* seed oil: geranylgeraniol as the major bioactive component. **Parasitology research**, v. 103, n. 1, p. 111–7, jun. 2008.

MIGNANI, S.; HUBER, S.; TOM??S, H.; RODRIGUES, J.; MAJORAL, J. P. Why and how have drug discovery strategies in pharma changed? What are the new mindsets? **Drug Discovery Today**, v. 21, n. 2, p. 239–249, 2016.

MISSLITZ, A.; MOTTRAM, J. C.; OVERATH, P.; AEBISCHER, T. Targeted integration into a rRNA locus results in uniform and high level expression of transgenes in *Leishmania amastigotes*. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 107, n. 2, p. 251–61, 15 abr. 2000.

MOLINA, I.; GÓMEZ I PRAT, J.; SALVADOR, F.; TREVIÑO, B.; SULLEIRO, E.; SERRE, N.; POU, D.; ROURE, S.; CABEZOS, J.; VALERIO, L.; BLANCO-GRAU, A.; SÁNCHEZ-MONTALVÁ, A.; VIDAL, X.; PAHISSA, A. Randomized trial of posaconazole and benznidazole for chronic Chagas' disease. **The New England journal of medicine**, v. 370, n. 20, p. 1899–908, 2014.

MONCAYO, A. **Chagas Disease: Current Epidemiological Trends after the Interruption of Vectorial and Transfusional Transmission in the Southern Cone Countries** *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*, 2003.

MONTE NETO, R. L.; BARBOSA FILHO, J. M.; SOUSA, L. M. A.; ATHAYDE FILHO, P. F.; DIAS, C. S.; OLIVEIRA, M. R. Crude ethanolic extract, lignoid fraction and yangambin from *Ocotea ducket* (Lauraceae) show antileishmanial activity. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 62, p. 348–352, 2007.

MONTENEGRO, H.; GUTIERREZ, M.; ROMERO, L. I.; ORTEGA-BARRÍA, E.; CAPSON, T. L.; CUBILLA-RIOS, L. Aphorphine alkaloids from *Gutteria* spp. with Leshmanicidal activity. v. 69, p. 677–679, 2003.

MORAIS, L. C. S. L.; ALMEIDA, R. N. Central depressant effects of reticuline extracted from *Ocotea duckei* in rats and mice. v. 62, p. 57–61, 1998.

MORETTI, C.; SAUVAIN, M.; LAVAUD, C.; MASSIOT, G.; BRAVO, J. a.; MUÑOZ, V. A novel antiprotozoal aminosteroid from *Saracha punctata*. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 45, p. 1390–1393, 1998.

MORGAN, D. O. **The Cell Cycle: Principles of Control**. 1. ed. London: New Science Press Ltda, 2007.

MORS, W. B.; GOTTLIEB, O. R.; DJERASSI, C. The Chemistry of Rosewood. Isolation and Structure of Anibine and 4-Methoxyparacotoin 1. **Journal of the American Chemical Society**, v. 79, n. 16, p. 4507–4511, ago. 1957.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of immunological methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

MOTTRAM, J. C.; KINNAIRD, J. H.; SHIELS, B. R.; TAIT, A.; BARRY, J. D. A novel CDC2-related protein kinase from *Leishmania mexicana*, LmmCRK1, is post-translationally regulated during the life cycle. **Journal of Biological Chemistry**, v. 268, n. 28, p. 21044–21052, 1993.

MOTTRAM, J. C.; MCCREARY, B. P.; BROWN, K. G.; GRANT, K. M. Gene disruptions indicate an essential function for the LmmCRK1 cdc2-related kinase of *Leishmania mexicana*. **Molecular microbiology**, v. 22, n. 3, p. 573–83, nov. 1996.

MUKHTAR, E.; ADHAMI, V. M.; MUKHTAR, H. Targeting microtubules by natural agents for cancer therapy. **Molecular cancer therapeutics**, v. 13, n. 2, p. 275–84, 2014.

MUNDAY, J. C.; MCLUSKEY, K.; BROWN, E.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Oligopeptidase B deficient mutants of *Leishmania major*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 175, n. 1, p. 49–57, jan. 2011.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. In: *Lancet*, **Anais...**2005.

MURTA, S. M. F.; KRIEGER, M. a.; MONTENEGRO, L. R.; CAMPOS, F. F. M.; PROBST, C. M.; ÁVILA, A. R.; MUTO, N. H.; OLIVEIRA, R. C. De; NUNES, L. R.; NIRDÉ, P.; BRUNA-ROMERO, O.; GOLDENBERG, S.; ROMANHA, A. J. Deletion of copies of the gene encoding old yellow enzyme (TcOYE), a NAD(P)H flavin oxidoreductase, associates with *in vitro*-induced benznidazole resistance in *Trypanosoma cruzi*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 146, p. 151–162, 2006.

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. 22, p. 11305–11347, 26 nov. 2014.

NAULA, C.; PARSONS, M.; MOTTRAM, J. C. Protein kinases as drug targets in trypanosomes and *Leishmania*. **Biochimica et Biophysica Acta - Proteins and Proteomics**, v. 1754, p. 151–159, 2005.

NDJONKA, D.; RAPADO, L. N.; SILBER, A. M.; LIEBAU, E.; WRENGER, C. Natural products as a source for treating neglected parasitic diseases. **International journal of molecular sciences**, v. 14, n. 2, p. 3395–439, jan. 2013.
NELSON, D. L.; COX, M. M. **Lehninger Principles of Biochemistry**. Fifth Edit ed. [s.l.] W.H. Freeman & Company, 2008.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 25 mar. 2016.

NGUYEN, H. V.; CARUSO, D.; LEBRUN, M.; NGUYEN, N. T.; TRINH, T. T.; MEILE, J.-C.; CHU-KY, S.; SARTER, S. Antibacterial activity of *Litsea cubeba* (Lauraceae, May Chang) and its effects on the biological response of common carp *Cyprinus carpio* challenged with *Aeromonas hydrophila*. **Journal of Applied Microbiology**, v. 121, n. 2, p. 341–351, 2016.

NIE, Z.-L.; WEN, J.; SUN, H. Phylogeny and biogeography of *Sassafras* (Lauraceae) disjunct between eastern Asia and eastern North America. **Plant Systematics and Evolution**, v. 267, n. 1–4, p. 191–203, 1 ago. 2007.

NIIMI, T. Leishmania tarentolae for the Production of Multi-subunit Complexes. In: VEGA, M. C. (Ed.). **Advanced Technologies for Protein Complex Production and Characterization**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p. 155–165.

NUGENT, P. G.; KARSANI, S. A.; WAIT, R.; TEMPERO, J.; SMITH, D. F. Proteomic analysis of *Leishmania mexicana* differentiation. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 136, n. 1, p. 51–62, jul. 2004.

NURSE, P. Universal control mechanism regulating onset of M-phase. **Nature**, v. 5, n. 344(6266), p. 503–8, 1990.

OGUNGBE, I. V.; SETZER, W. N. The Potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases-Part III: In-Silico molecular docking investigations. **Molecules**, v. 21, n. 10, 2016.

ORDÓÑEZ-GUTIÉRREZ, L.; ESPADA-FERNÁNDEZ, R.; DEA-AYUELA, M. A.; TORRADO, J. J.; BOLÁS-FERNANDEZ, F.; ALUNDA, J. M. *In vitro* effect of new formulations of amphotericin B on amastigote and promastigote forms of *Leishmania infantum*. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 30, p. 325–329, 2007.

OTTO, T.; SICINSKI, P. Cell cycle proteins as promising targets in cancer therapy. **Nature Publishing Group**, v. 17, n. 2, p. 93–115, 2017.

PADDON, C. J.; KEASLING, J. D. Semi-synthetic artemisinin: a model for the use of synthetic biology in pharmaceutical development. **Nature Reviews Microbiology**, v. 12, n. 5, p. 355–367, 2014.

PARK, J. J.; SEO, S. M.; KIM, E. J.; LEE, Y. J.; KO, Y. G.; HA, J.; LEE, M. Berberine inhibits human colon cancer cell migration via AMP-activated protein kinase-mediated downregulation of integrin $\beta 1$ signaling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 426, n. 4, p. 461–467, 2012.

PARSONS, M.; WORTHEY, E. A.; WARD, P. N.; MOTTRAM, J. C. Comparative analysis of the kinomes of three pathogenic trypanosomatids: *Leishmania major*, *Trypanosoma brucei* and *Trypanosoma cruzi*. **BMC genomics**, v. 6, p. 127, 15 set. 2005.

PARTHA, R.; DAS S; AUDDY RG, M. A. **Biological targeting and drug delivery in control of Leishmaniasis** **Journal of Cell and Animal Biology**, 2012. .

PATTERSON, H.; NIBBS, R.; MCINNES, I.; SIEBERT, S. Protein kinase inhibitors in the treatment of inflammatory and autoimmune diseases. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 176, n. 1, p. 1–10, 2014.

PATWARDHAN, B.; GAUTAM, M. Botanical immunodrugs: Scope and opportunities. **Drug Discovery Today**, v. 10, n. 7, p. 495–502, 2005.

PAULIN, J. J. The chondriome of selected trypanosomatids. A three-dimensional study based on serial thick sections and high voltage electron microscopy. **Journal of Cell Biology**, v. 66, n. 2, p. 404–413, 1975.

PEDROSO, R. B.; TONIN, L. T. D.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. P. D.; SARRAGIOTTO, M. H.; NAKAMURA, C. V. Beta-carboline-3-carboxamide derivatives as promising antileishmanial agents. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, v. 105, n. 8, p. 549–557, 2011.

PELIZZARO-ROCHA, K. J.; TIUMAN, T. S.; IZUMI, E.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V. Synergistic effects of parthenolide and benznidazole on *Trypanosoma cruzi*. **Phytomedicine**, v. 18, p. 36–39, 2010.
PETRI, E. T.; ERRICO, A.; ESCOBEDO, L.; HUNT, T.; BASAVAPPA, R. The crystal structure of human cyclin B. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 6, n. 11, p. 1342–9, 1 jun. 2007.

PINES, J. Cell cycle : Reaching for a role for the Cks proteins The Cks proteins are essential components of the. p. 1399–1402, 1996.

PINES, J.; HUNTER, T. Cyclin-dependent kinases : a new cell cycle motif ? **Trends Cell Biol.**, v. 1, p. 117–121, 1991.

PLIMMER, H. G.; THOMSON, J. D. Further Results of the Experimental Treatment of Trypanosomiasis in Rats; Being a Progress Report of a Committee of the Royal Society. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 80, n. 536, p. 1–10, 4 fev. 1908.

PRELICH, G. Gene overexpression: Uses, mechanisms, and interpretation. **Genetics**, v. 190, n. 3, p. 841–854, 2012.

QIU, S.; SUN, H.; ZHANG, A. H.; XU, H. Y.; YAN, G. L.; HAN, Y.; WANG, X. J. Natural alkaloids: Basic aspects, biological roles, and future perspectives. **Chinese Journal of Natural Medicines**, v. 12, n. 6, p. 401–406, 2014.

RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious disease clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275–91, 2012.

RASSI, A.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**, v. 375, p. 1388–1402, 2010.

RAVEL, C.; CORTES, S.; PRATLONG, F.; MORIO, F.; DEDET, J. P.; CAMPINO, L. First report of genetic hybrids between two very divergent *Leishmania* species: *Leishmania infantum* and *Leishmania major*. **International Journal for Parasitology**, v. 36, n. 13, p. 1383–1388, 2006.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J.-C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet infectious diseases**, v. 7, p. 581–596, 2007.

RINE, J.; HANSEN, W.; HARDEMAN, E.; DAVIS, R. W. Targeted selection of recombinant clones through gene dosage effects (*Saccharomyces cerevisiae*/recombinant DNA/metabolic inhibitors/UDP-N-acetylglucosamine-1-P transferase/ 3-hydroxy-3-methyl glutaryl CoA reductase). **Biochemistry**, v. 80, n. November, p. 6750–6754, 1983.

ROBINSON, S. L.; PANACCIONE, D. G. Heterologous Expression of Lysergic Acid and Novel Ergot Alkaloids in *Aspergillus fumigatus*. **Applied and Environmental Microbiology**, v. 80, n. 20, p. 6465–6472, 15 out. 2014.

RODRIGUES, I. a.; AZEVEDO, M. M. B.; CHAVES, F. C. M.; ALVIANO, C. S.; ALVIANO, D. S.; VERMELHO, A. B. *Arrabidaea chica* hexanic extract induces mitochondrion damage and peptidase inhibition on *Leishmania* spp. **BioMed Research International**, v. 2014, 2014a.

RODRIGUES, J. C. F.; CONCEPCION, J. L.; RODRIGUES, C.; CALDERA, A.; URBINA, J. a.; DE SOUZA, W. *In vitro* activities of ER-119884 and E5700, two potent squalene synthase inhibitors, against *Leishmania amazonensis*: Antiproliferative, biochemical, and ultrastructural effects. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 52, n. 11, p. 4098–4114, 2008.

RODRIGUES, J. C. F.; GODINHO, J. L. P.; DE SOUZA, W. . Biology of Human Pathogenic Trypanosomatids: Epidemiology, Lifecycle and Ultrastructure. In: **Proteins and Proteomics of Leishmania and Trypanosoma, Subcellular Biochemistry**. [s.l: s.n.]p. 1–42.

RODRIGUES, J. C. F.; URBINA, J. a.; DE SOUZA, W. Antiproliferative and ultrastructural effects of BPQ-OH, a specific inhibitor of squalene synthase, on *Leishmania amazonensis*. **Experimental Parasitology**, v. 111, p. 230–238, 2005.

RODRIGUES, J. H. D. S.; UEDA-NAKAMURA, T.; CORRÊA, A. G.; SANGI, D. P.; NAKAMURA, C. V. A quinoxaline derivative as a potent chemotherapeutic agent, alone or in combination with benznidazole, against *Trypanosoma cruzi*. **PLoS one**, v. 9, n. 1, p. e85706, 2014b.

ROMANO, A.; INBAR, E.; DEBRABANT, A.; CHARMOY, M.; LAWYER, P.; RIBEIRO-GOMES, F.; BARHOUMI, M.; GRIGG, M.; SHAIK, J.; DOBSON, D.; BEVERLEY, S. M.; SACKS, D. L. Cross-species genetic exchange between visceral and cutaneous strains of *Leishmania* in the sand fly vector. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 47, p. 16808–13, 25 nov. 2014.

SAGI, S.; AVULA, B.; WANG, Y.-H.; KHAN, I. A. Quantification and characterization of alkaloids from roots of *Rauwolfia serpentina* using ultra-high performance liquid chromatography-photo diode array-mass spectrometry. **Analytical and bioanalytical chemistry**, v. 408, n. 1, p. 177–90, jan. 2016.

SAHASRABUDDHE, A. A.; BAJPAI, V. K.; GUPTA, C. M. A novel form of actin in *Leishmania*: Molecular characterisation, subcellular localisation and association with subpellicular microtubules. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 134, n. 1, p. 105–114, 2004.

SALEEM, M.; NAZIR, M.; ALI, M. S.; HUSSAIN, H.; LEE, Y. S.; RIAZ, N.; JABBAR, A. Antimicrobial natural products: an update on future antibiotic drug candidates. **Natural product reports**, v. 27, p. 238–254, 2010.

SANCHEZ-SUAREZ, J.; RIVEROS, I.; DELGADO, G. Evaluation of the Leishmanicidal and Cytotoxic Potential of Essential Oils Derived From Ten Colombian Plants. **Iranian J Parasitol**, v. 8, n. 1, p. 129–136, 2013.

SANDERSON, L.; YARDLEY, V.; CROFT, S. L. Activity of anti-cancer protein kinase inhibitors against *Leishmania* spp. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. March, p. 1888–1891, 2014.

SANTHAMMA, K. R.; BHADURI, A. Characterization of the respiratory chain of *Leishmania donovani* promastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 75, p. 43–53, 1995.

SANTRICH, C.; MOORE, L.; SHERWIN, T.; BASTIN, P.; BROKAW, C.; GULL, K.; LEBOWITZ, J. H. A motility function for the paraflagellar rod of *Leishmania* parasites revealed by PFR-2 gene knockouts. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 90, n. 1, p. 95–109, 1997.

SCHINOR, E. C.; SALVADOR, M. J.; PRAL, E. M. F.; ALFIERI, S. C.; ALBUQUERQUE, S.; DIAS, D. A. Effect of extracts and isolated compounds from *Chresta scapigera* on viability of *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, 2007.

SCHMIDT, T. J.; KHALID, S. a; ROMANHA, a J.; ALVES, T. M.; BIAVATTI, M. W.; BRUN, R.; DA COSTA, F. B.; DE CASTRO, S. L.; FERREIRA, V. F.; DE LACERDA, M. V. G.; LAGO, J. H. G.; LEON, L. L.; LOPES, N. P.; DAS NEVES AMORIM, R. C.; NIEHUES, M.; OGUNGBE, I. V.; POHLIT, a M.; SCOTTI, M. T.; SETZER, W. N.; DE N C SOEIRO, M.; STEINDEL, M.; TEMPONE, a G. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - part I. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 14, p. 2128–75, jan. 2012.

SEN, N.; MAJUMDER, H. K. Mitochondrion of protozoan parasite emerges as potent therapeutic target: exciting drugs are on the horizon. **Current pharmaceutical design**, v. 14, p. 839–846, 2008.

SENGUPTA, S.; CHOWDHURY, S.; BOSEDASGUPTA, S.; WRIGHT, C. W.; MAJUMDER, H. K. Cryptolepine-Induced Cell Death of *Leishmania donovani* Promastigotes Is Augmented by Inhibition of Autophagy. **Molecular biology international**, v. 2011, p. 187850, 2011.

SHARMA, V.; SARKAR, I. N. Leveraging biodiversity knowledge for potential phyto-therapeutic applications. **Journal of the American Medical Informatics Association : JAMIA**, v. 20, n. 4, p. 668–79, 2013.

SHEN, T.; CHEN, X. M.; HARDER, B.; LONG, M.; WANG, X. N.; LOU, H. X.; WONDARK, G. T.; REN, D. M.; ZHANG, D. D. Plant Extracts of the Family Lauraceae: A Potential Resource for Chemopreventive Agents that Activate the Nuclear Factor-Erythroid 2-Related Factor 2/Antioxidant Response Element Pathway. **Planta Medica**, v. 80, n. 5, p. 426–434, 2014.

SHUKLA, S.; BAJPAI, V. K.; KIM, M. **Plants as potential sources of natural immunomodulators** *Reviews in Environmental Science and Biotechnology*, 2014. .

SILVA, J. R. A.; DO CARMO, D. F.; REIS, E. M.; MACHADO, G. M. C.; LEON, L. L.; DA SILVA, B. O.; FERREIRA, J. L. P.; AMARAL, A. C. F. Chemical and biological evaluation of essential oils with economic value from lauraceae species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1071–1076, 2009.

SOUZA, V. C.; LORENZI, H. **Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Angiospermas da flora brasileira, baseado em APG II**. [s.l.] Instituto Plantarum, 2005.

SOUZA CONCEIÇÃO, R.; DE A. CARNEIRO, M. M. A.; ALVES REIS, I. M.; BRANCO, A.; CURCINO VIEIRA, I. J.; BRAZ-FILHO, R.; BORGES BOTURA, M. *In vitro* acaricide activity of *Ocotea aciphylla* (Nees) Mez. (Lauraceae) extracts and identification of the compounds from the active fractions. **Ticks and Tick-borne Diseases**, v. 8, n. 2, p. 275–282, 2017.

SOUZA, A. D. de. **ISOLAMENTO DE ALCALOIDES E ATIVIDADES BIOLÓGICAS DE ESPÉCIES DE LAURACEAE DA AMAZÔNIA**. 2014. Universidade Federal do Amazonas, 2014.

SOUZA, W. de; ATTIAS, M. Subpellicular Microtubules in Apicomplexa and Trypanosomatids. In: DE SOUZA, W. (Ed.). **Structures and Organelles in Pathogenic Protists**. New York: Springer Berlin Heidelberg, 2010. 17p. 227–252. SPRINGOB, K.; KUTCHAN, T. M. Introduction to the Different Classes of Natural Products. In: OSBOURN, ANNE E., L. (Ed.). **Plant-derived Natural Products Synthesis, Function, and Application**. 1. ed. [s.l.] Springer-Verlag New York, 2009. p. 3–50.

STANDART, N.; MINSHUL, J.; PINES, J.; HUNT, T. Cyclin Synthesis , Modification and Destruction during Meiotic Maturation of the Starfish Oocyte. v. 258, p. 248–258, 1987.

STEFANELLO, T. F.; PANICE, M. R.; UEDA-NAKAMURA, T.; SARRAGIOTTO, M. H.; AUZELY-VELTY, R.; NAKAMURA, C. V. N-Butyl-[1-(4-Methoxy)Phenyl]-9H-Carboline]-3-Carboxamide Prevents Cytokinesis in *Leishmania amazonensis*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, p. 7112–7120, 2014.

STEINDEL, M.; KRAMER PACHECO, L.; SCHOLL, D.; SOARES, M.; DE MORAES, M. H.; EGER, I.; KOSMANN, C.; SINCERO, T. C. M.; STOCO, P. H.; MURTA, S. M. F.; DE CARVALHO-PINTO, C. J.; GRISARD, E. C. Characterization of *Trypanosoma cruzi* isolated from humans, vectors, and animal reservoirs following an outbreak of acute human Chagas disease in Santa Catarina State, Brazil. **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 60, p. 25–32, 2008.

STEVENSON, M. M.; SU, Z.; SAM, H.; MOHAN, K. Modulation of host responses to blood-stage malaria by interleukin-12: from therapy to adjuvant activity. **Microbes and infection**, v. 3, n. 1, p. 49–59, jan. 2001.

STUART, K.; BRUN, R.; CROFT, S.; FAIRLAMB, A.; GÜRTLER, R. E.; MCKERROW, J.; REED, S.; TARLETON, R. Review series Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. v. 118, n. 4, p. 1301–1310, 2008.

SUN, Y.; CHEN, X.; XIAO, D. Tetracycline-inducible expression systems: New strategies and practices in the transgenic mouse modeling. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 39, n. 4, p. 235–246, 2007.

TAMMANA, T. V. S.; SAHASRABUDDHE, A. a; BAJPAI, V. K.; GUPTA, C. M. ADF/cofilin-driven actin dynamics in early events of *Leishmania* cell division. **Journal of cell science**, v. 123, p. 1894–1901, 2010.

TANE, S.; CHIBAZAKURA, T. Cyclin A overexpression induces chromosomal double-strand breaks in mammalian cells. **Cell cycle (Georgetown, Tex.)**, v. 8, n. 23, p. 3900–3, dez. 2009.

TANG, Q.; LI, S.; ZHANG, H.; WEI, Y.; WU, H.; LIU, J.; WANG, Y.; LIU, D.; ZHANG, Z.; LIU, C. Correlation of the cyclin A expression level with porcine circovirus type 2 propagation efficiency. **Archives of Virology**, v. 158, n. 12, p. 2553–2560, 9 dez. 2013.

TEIXEIRA, D. E.; BENCHIMOL, M.; CREPALDI, P. H.; DE SOUZA, W. **Atlas didático Ciclo de vida do *Trypanosoma cruzi***. 1st. ed. Rio de Janeiro: Fundação CECIERJ, Consórcio CEDERJ, 2011.

TEMPONE, a. G.; TREIGER BORBOREMA, S. E.; DE ANDRADE, H. F.; DE AMORIM GUALDA, N. C.; YOGI, Á.; SALERNO CARVALHO, C.; BACHIEGA, D.; LUPO, F. N.; BONOTTO, S. V.; FISCHER, D. C. H. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine**, v. 12, n. 5, p. 382–390, 2005.

TOBIN, J. F.; REINER, S. L.; HATAM, F.; ZHENG, S.; LEPTAK, C. L.; WIRTH, D. F.; LOCKSLEY, R. M. Transfected *Leishmania* expressing biologically active IFN-gamma. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 150, n. 11, p. 5059–69, 1 jun. 1993.

URBINA, J. a. Ergosterol biosynthesis and drug development for Chagas disease. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. May, p. 311–318, 2009.

URRA, F. A.; ARAYA-MATURANA, R. Targeting Mitochondrial Bioenergetics of cancer cells with alkaloids: Mechanism and anti-cancer strategies. In: SOBARZO-SÁNCHEZ, E. (Ed.). **Alkaloids: Biosynthesis, Biological Roles and Health Benefits**. 1. ed. [s.l.] Nova Science Publishers, 2015. p. 1–36.

VALDEZ, R. H.; TONIN, L. T. D.; UEDA-NAKAMURA, T.; SILVA, S. O.; DIAS FILHO, B. P.; KANESHIMA, E. N.; YAMADA-OGATTA, S. F.; YAMAUCHI, L. M.; SARRAGIOTTO, M. H.; NAKAMURA, C. V. *In vitro* and *in vivo* trypanocidal synergistic activity of N-butyl-1-(4-dimethylamino)phenyl-1,2,3,4-tetrahydro- β -carboline-3-carboxamide associated with benznidazole. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 56, n. 1, p. 507–12, jan. 2012.

VALENTE, S. A. da S.; DA COSTA VALENTE, V.; DAS NEVES PINTO, A. Y.; DE JESUS BARBOSA CÉSAR, M.; DOS SANTOS, M. P.; MIRANDA, C. O. S.; CUERVO, P.; FERNANDES, O. Analysis of an acute Chagas disease outbreak in the Brazilian Amazon: human cases, triatomines, reservoir mammals and parasites. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 103, n. 3, p. 291–297, 2009.

VERMA, N. K.; DEY, C. S. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, p. 3010–3015, 2004.

VICENTINI, A., H. V. D. WERFF, and S. N. Lauraceae. In: RIBEIRO, J.E.L. DA S., M.J.G. HOPKINS, A. VICENTINI, C.A. SOTHERS, M.A. DA S. COSTA, J.M. DE BRITO, M.A.D. DE SOUZA, L.H.P. MARTINS, L.G. LOHMANN, P.A.C.L. ASSUNÇÃO, E. DA C. PEREIRA, C.F. DA SILVA, M.R. MESQUITA, AND L. C. P. (Ed.). **Flora da Reserva Ducke – Guia de identificação das plantas vasculares de uma floresta de terra-firme na Amazônia Central**. Manaus: INPA-DFID, 1999. 1p. 150–179.

VIOTTI, R.; VIGLIANO, C.; LOCOCO, B.; BERTOCCHI, G.; PETTI, M.; ALVAREZ, M. G.; POSTAN, M.; ARMENTI, A. Long-term cardiac outcomes of treating chronic chagas disease with benznidazole versus no treatment: A nonrandomized trial. **Annals of Internal Medicine**, v. 144, p. 724–734, 2006.

VOLPATO, H.; DESOTI, V. C.; COGO, J.; PANICE, M. R.; SARRAGIOTTO, M. H.; SILVA, S. D. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; NAKAMURA, C. V. The Effects of N-Butyl-1-(4-dimethylamino)phenyl-1,2,3,4- tetrahydro- β -carboline-3-carboxamide against *Leishmania amazonensis* Are Mediated by Mitochondrial Dysfunction. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2013, p. 1–7, 2013.

WALKER, R. G.; THOMSON, G.; MALONE, K.; NOWICKI, M. W.; BROWN, E.; DAVID, G.; TURNER, N. J.; WALKINSHAW, M. D.; GRANT, K. M.; MOTTRAM, J. C. High Throughput Screens Yield Small Molecule Inhibitors of Leishmania CRK3 : CYC6 Cyclin-Dependent Kinase. v. 5, n. 4, 2011.

WANG, Q.; MELZER, I. M.; KRUSE, M.; SANDER-JUELCH, C.; WIESE, M. LmxMPK4, a mitogen-activated protein (MAP) kinase homologue essential for promastigotes and amastigotes of *Leishmania mexicana*. **Kinetoplastid biology and disease**, v. 4, p. 6, 29 dez. 2005.

WANI, M. C.; TAYLOR, H. L.; WALL, M. E.; COGGON, P.; MCPHAIL, A. T. Plant antitumor agents. VI. The isolation and structure of taxol, a novel antileukemic and antitumor agent from *Taxus brevifolia*. **Journal of the American Chemical Society**, v. 93, n. 9, p. 2325–2327, 1971.

WHEELER, R. J.; GLUENZ, E.; GULL, K. The cell cycle of Leishmania: Morphogenetic events and their implications for parasite biology. **Molecular Microbiology**, v. 79, n. December 2010, p. 647–662, 2011.

WIESE, M. A mitogen-activated protein (MAP) kinase homologue of *Leishmania mexicana* is essential for parasite survival in the infected host. **EMBO Journal**, v. 17, n. 9, p. 2619–2628, 1998.

WILKINSON, S. R.; TAYLOR, M. C.; HORN, D.; KELLY, J. M.; CHEESEMAN, I. A mechanism for cross-resistance to nifurtimox and benznidazole in trypanosomes. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 5022–5027, 2008.

WINK, M. **Ecological Roles of Alkaloids**. [s.l.] WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, 2008.

WIRTZ, E.; CLAYTON, C. Inducible gene expression in trypanosomes mediated by a prokaryotic repressor. **Science (New York, N.Y.)**, v. 268, n. 5214, p. 1179–83, 1995.

WIRTZ, E.; HARTMANN, C.; CLAYTON, C. Gene expression mediated by bacteriophage T3 and T7 RNA polymerases in transgenic trypanosomes. **Nucleic acids research**, v. 22, n. 19, p. 3887–94, 1994.

WIRTZ, E.; LEAL, S.; OCHATT, C.; CROSS, G. A. M. A tightly regulated inducible expression system for conditional gene knock-outs and dominant-negative genetics in *Trypanosoma brucei*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 99, n. 1, p. 89–101, 1999.

WOODWARD, R.; GULL, K. Timing of Nuclear and Kinetoplast DNA Replication and Early Morphological Events in the Cell Cycle of *Trypanosoma Brucei*. **Journal of cell science**, v. 95 (Pt 1), p. 49–57, jan. 1990.

WRIGHT, C. W.; ADDAE-KYEREME, J.; BREEN, a. G.; BROWN, J. E.; COX, M. F.; CROFT, S. L.; GÖKÇEK, Y.; KENDRICK, H.; PHILLIPS, R. M.; POLLET, P. L. Synthesis and evaluation of cryptolepine analogues for their potential as new antimalarial agents. **Journal of Medicinal Chemistry**, v. 44, p. 3187–3194, 2001.

YAMAGUCHI, K. **ESTUDOS BIOLÓGICOS DOS EXTRATOS E COMPOSIÇÃO QUÍMICA DOS ÓLEOS ESSENCIAIS DE ESPÉCIES DA FAMÍLIA LAURACEAE**. 2011. Universidade Federal do Amazonas, 2011.

YAMAGUCHI, K.; ALCANTARA, J.; LIMA, E.; VEIGA-JUNIOR, V. Chemical Composition and Platelet Aggregation Activity of Essential Oils of Two Species of the Genus *Ocotea* (Lauraceae). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 16, n. 4, p. 518–523, 4 jul. 2013.

YAMAGUCHI, K.; ALCÂNTARA, J.; VEIGA JUNIOR, V. F. Da. Investigação do potencial antioxidante e anticolinesterásico de 20 espécies da família Lauraceae. **Acta Amazonica**, v. 42, n. 4, p. 541–546, 2012.

YAN, S.; MYLER, P. J.; STUART, K. Tetracycline regulated gene expression in *Leishmania donovani*. **Mol Biochem Parasitol**, v. 112, n. 1, p. 61–69, 2001.

ZAGHLOUL, I. Y.; AL-JASSER, M. Effect of renal impairment on the pharmacokinetics of antimony in hamsters. **Annals of tropical medicine and parasitology**, v. 98, p. 793–800, 2004.

ZANIN, S. M. W.; LORDELLO, A. L. L. Alcalóides aporfinóides do gênero *Ocotea* (Lauraceae). **Química Nova**, v. 30, p. 92–98, 2007.

ZHAO, M.; BI, L.; WANG, W.; WANG, C.; BAUDY-FLOCH, M.; JU, J.; PENG, S. Synthesis and cytotoxic activities of beta-carboline amino acid ester conjugates. **Bioorganic & medicinal chemistry**, v. 14, p. 6998–7010, 2006.

APÊNDICE A

Capítulo I – Resultados fitoquímicos complementares do capítulo I

Neste apêndice serão apresentados os resultados complementares de cromatografia de camada delgada dos extratos e frações bem como espectrometria de massas das frações alcaloídicas.

1. Cromatografia em camada delgada dos extratos etanólicos revelados por Dragendorff.

Os extratos foram submetidos à Cromatografia em Camada Delgada (Figura 1). As placas cromatográficas em fase normal foram eluídas em CHCl_3 :MeOH (9:1) e reveladas com vanilina sulfúrica e o reagente específico para detecção de alcaloides, Dragendorff. O perfil dos alcaloides nas frações foi obtido por espectrometria de massa (IES EM/EM). As frações alcaloídicas foram solubilizadas em metanol e injetadas no espectrômetro de massas. Os espectros ESI-MS foram adquiridos a faixa de m/z 100 a 800 e avaliados por injeção direta das amostras em espectrômetro de massa com interface electrospray e analisador de *íon-trap* (FIA-ESI-IT-MS), obtidos em modo positivo $[\text{M}+\text{H}]^+$.

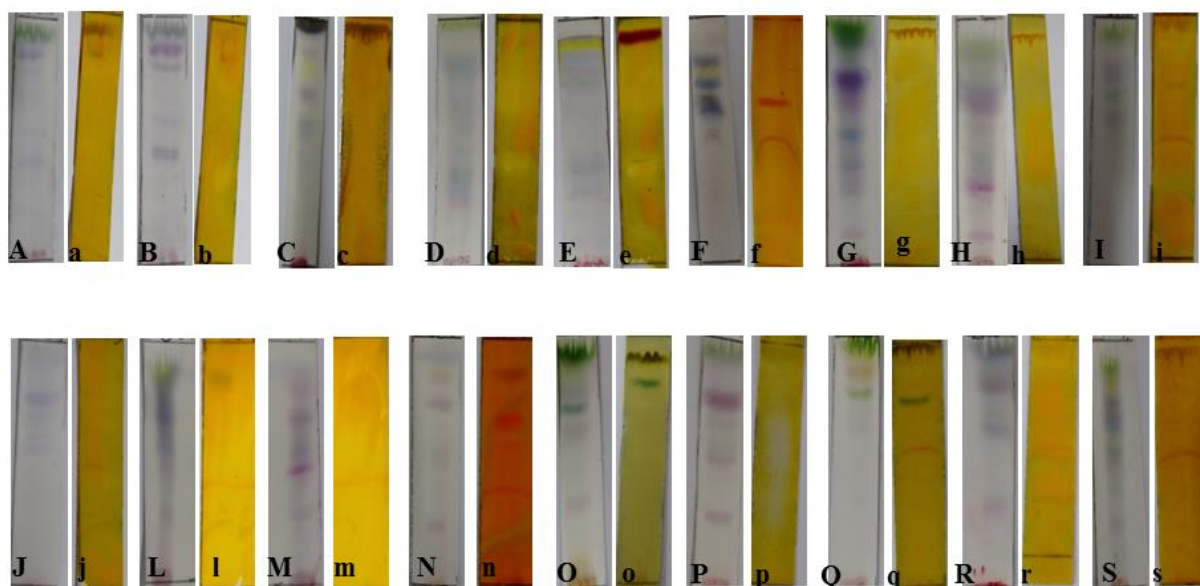


Figura 1- Cromatografia em camada delgada dos extratos etanólicos. Letras maiúsculas: revelação vanilina sulfúrica; Letras minúsculas: Dragendorff. (A, a) *A. ferrea* folhas; (B,b) *A. ferrea* galhos; (C,c) *A. parviflora* folhas; (D,d) *A. panurensis* folhas; (E,e) *A. panurensis* galhos; (F,f) *A. rosaeodora* galhos; (G,g) *L. canella angustata* folhas; (H,h) *L. canella angustata* galhos; (I,i) *L. martiniana* folhas; (J,j) *L. martiniana* galhos; (L,l) *M. duckei* folhas; (M,m) *M. duckei* galhos; (N,n) *O. leucoxyton* galhos; (O,o) *O. nigrescens* folhas; (P,p) *O. nigrescens* galhos; (Q,q) *P. bracteata* folhas; (R,r) *P. bracteata* galhos; (S,s) *R. peneia* galhos.

2. Cromatografia em camada delgada e espectrometria de massas das frações alcaloídicas.

As frações alcaloídicas foram analisadas em cromatografia em camada delgada em placas cromatográficas em fase normal. Foram eluídas em $\text{CHCl}_3:\text{MeOH}$ (9:1) e revelados com o reagente Dragendorff. (Figura 2). As frações alcaloídicas foram analisadas por espectrometria de (Figura 3).

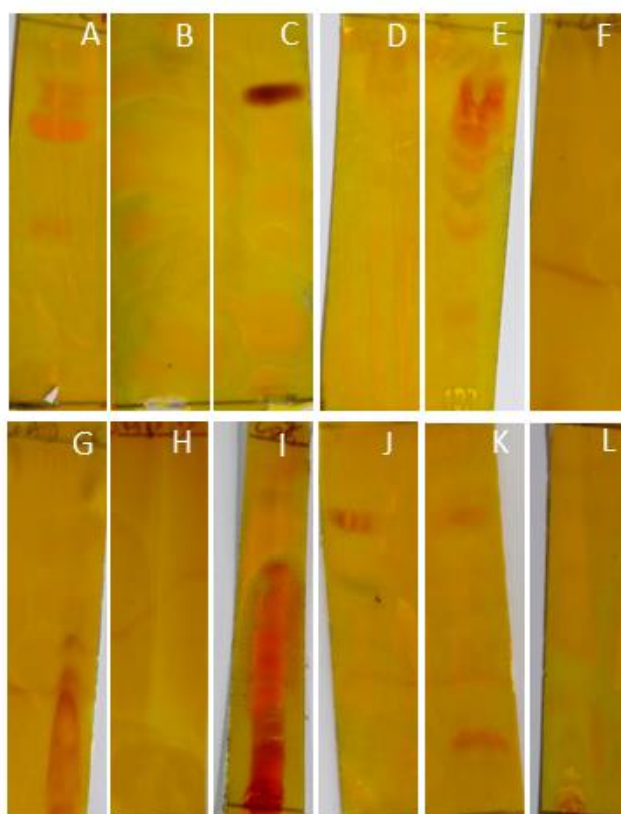
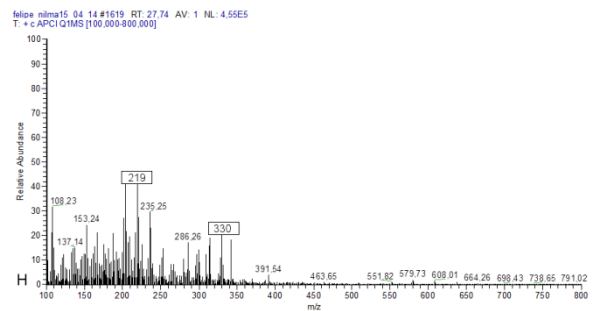
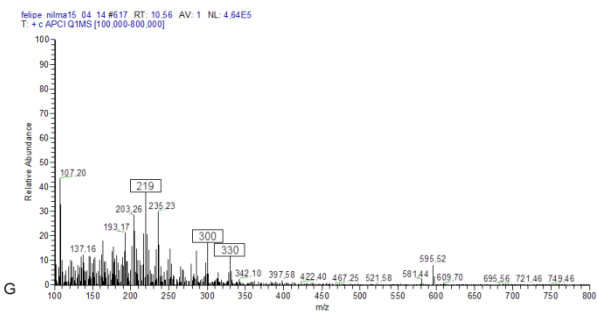
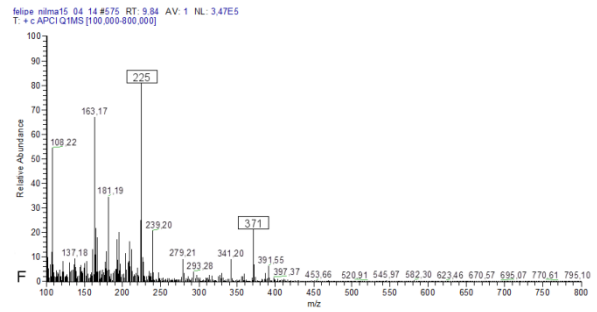
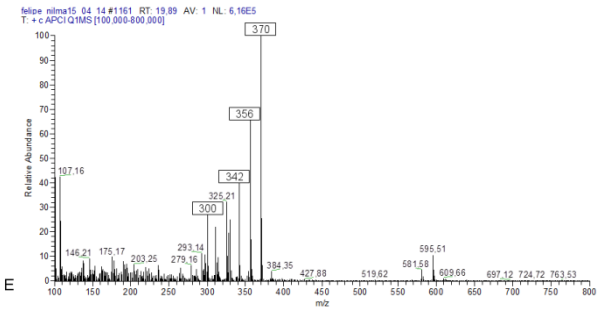
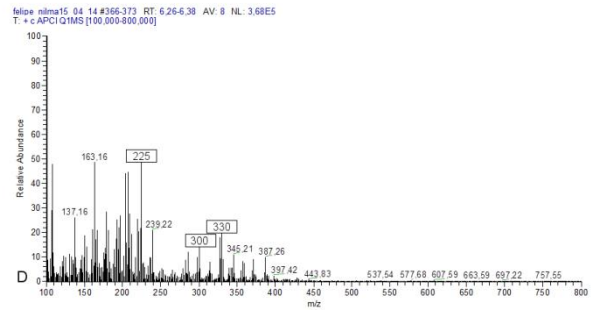
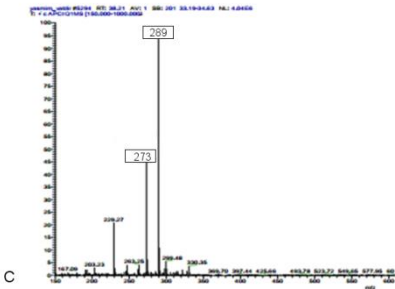
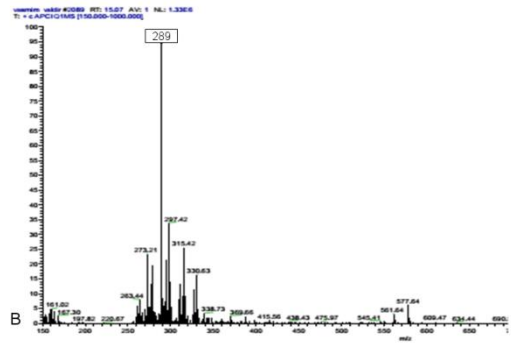
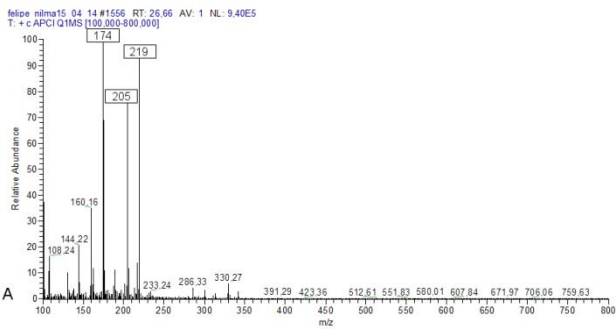


Figura 2- Cromatografia em camada delgada das frações alcalóidicas. (A) *A. ferrea* folhas; (B) *A. panurensis* folhas; (C) *A. panurensis* galhos; (D) *L. canella angustata* folhas; (E) *L. canella angustata* galhos; (F) *L. martiniana* folhas; (G) *L. martiniana* galhos; (H) *M. duckei* galhos; (I) *O. leucoxyton* galhos; (J) *P. bracteta* folhas; (K) *P. bracteta* galhos; (L) *R. peneia* galhos.



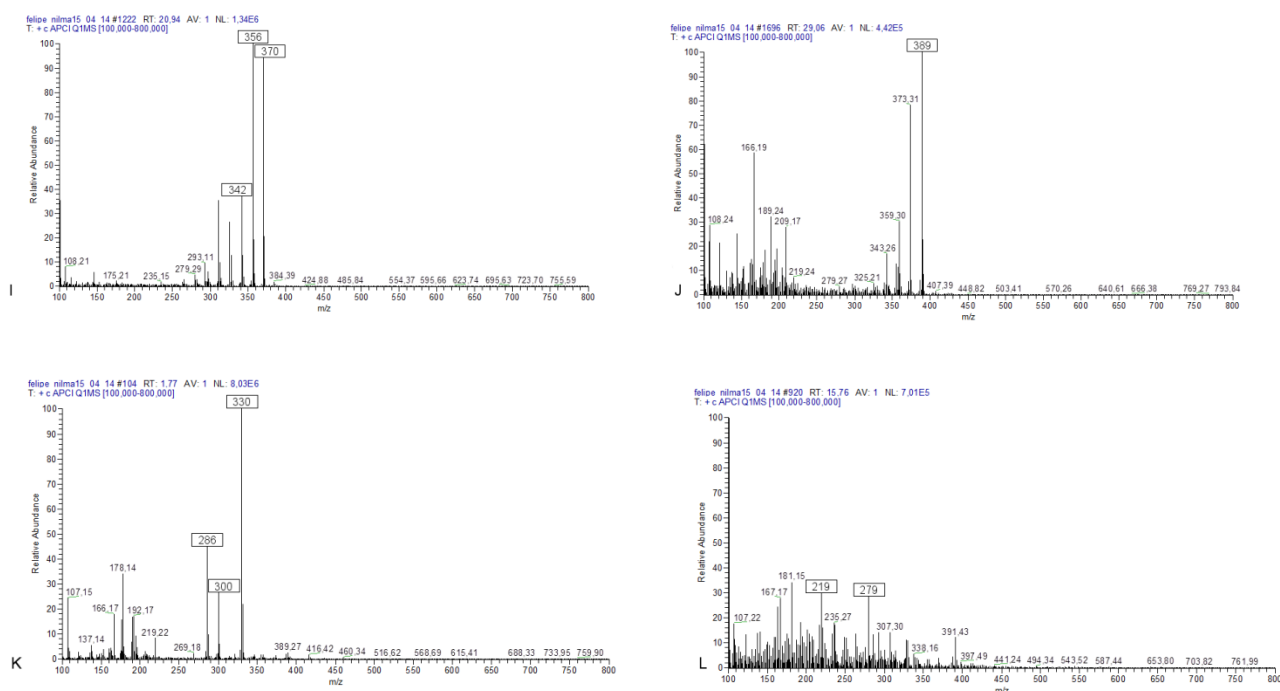


Figura 3 - Espectro de massas das frações alcalóidicas. Espectros correspondentes a inserção direta no modo positivo. (A) *A. ferrea* folhas; (B) *A. panurensis* folhas; (C) *A. panurensis* galhos; (D) *L. canella angustata* folhas; (E) *L. canella angustata* galhos; (F) *L. martiniana* folhas; (G) *L. martiniana* galhos; (H) *M. duckei* galhos; (I) *O. leucoxyton* galhos; (J) *P. bracteata* folhas; (K) *P. bracteta* galhos; (L) *R. peneia* galhos.

APÊNDICE B

Os resultados apresentados aqui são focados na atividade *in vitro* e *in vivo* dos extratos etanólicos de duas espécies. Estes extratos tiveram melhor atividade que as frações *in vitro* frente à *T. cruzi*, por isso foi decidido avaliá-los paralelamente quanto à atividade *in vivo*. O parecer de aprovação do comitê de ética da Universidade Federal de Maringá está anexo.

Serão apresentados aqui as figuras referentes aos resultados parciais obtidos. A análise destes está em andamento para preparação do manuscrito.

ATIVIDADE *in vitro* E *in vivo* DOS EXTRATOS ETANÓLICOS DE *Paraia bracteata* E *Rhodostemonodaphne Peneia*

Os extratos etanólicos e frações de *Paraia bracteata* e *Rhodostemonodaphne peneia* foram avaliados frente à forma tripomastigotas e epimastigota de *T. cruzi*. Na tabela abaixo observa-se que os extratos ativos, com concentrações responsáveis pelo CE₅₀ em tripomastigotas abaixo de 11 µg/mL.

Tabela 1 Atividade dos extratos etanólicos de folhas e galhos em formas tripomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi*. Os resultados estão em concentração responsável pela inibição do crescimento ou viabilidade dos parasitos em 50%. Os valores de CC₅₀ são referentes à atividade em linhagem celular LLCMK₂. NR: não realizado. DP: desvio padrão. IS_{tr}: índice de seletividade tripomastigotas. IS_{ep}: índice de seletividade epimastigotas.

| Espécies | Parte da planta | Tripomastigota | Epimastigota | LLCMK ₂ | IS _{Tripo} | IS _{Epi} |
|---------------------|-----------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|---------------------|-------------------|
| | | CE ₅₀ µg/mL ±DP | CI ₅₀ µg/mL ±DP | CC ₅₀ µg/mL ±DP | | |
| <i>P. bracteata</i> | Folhas | 10,9±1,2 | 45,0±7 | 150,0±56,5 | 13,8 | 3,3 |
| <i>P. bracteata</i> | Galhos | 5,7±0,7 | 21,8±3 | 106,0±29,7 | 18,6 | 4,9 |
| <i>R. peneia</i> | Galhos | 5,5±0,7 | 270,0±14,1 | 116,6±4,7 | 21,2 | 0,4 |

Analisando o efeito exercido pelos extratos etanólicos, observa-se que os extratos etanólicos dos galhos de *R. peneia* e *P. bracteata* foram os que apresentaram maior atividade contra tripomastigotas com CE₅₀ de 5,7 e 5,5 µg/mL, respectivamente. Devido a essa atividade, foi investigado o efeito destes extratos em amastigotas intracelular. Os extratos foram ativos contra a forma evolutiva intracelular de *T. cruzi* (Figura 1). Após o tratamento por 96 h, o índice de infecção das células LLCMK₂ é reduzido de forma dose-dependente. Tanto a quantidade de células infectadas quanto o número de amastigotas por célula é reduzido após o tratamento. A inibição de 50% das amastigotas é alcançada nas concentrações de 8 µg/mL para *R. peneia* e 12 µg/mL para *P. bracteata*.

Os extratos foram ativos contra a forma evolutiva intracelular de *T. cruzi* (Figura 6). Após o tratamento por 96 h, o índice de infecção das células LLCMK₂ é reduzido de forma dose-dependente. Tanto a quantidade de células infectadas quanto o número de amastigotas por célula é reduzido após o tratamento. A inibição

de 50% das amastigotas é alcançada nas concentrações de 8 $\mu\text{g/mL}$ para *R. peneia* e 12 $\mu\text{g/mL}$ para *P. bracteata*.

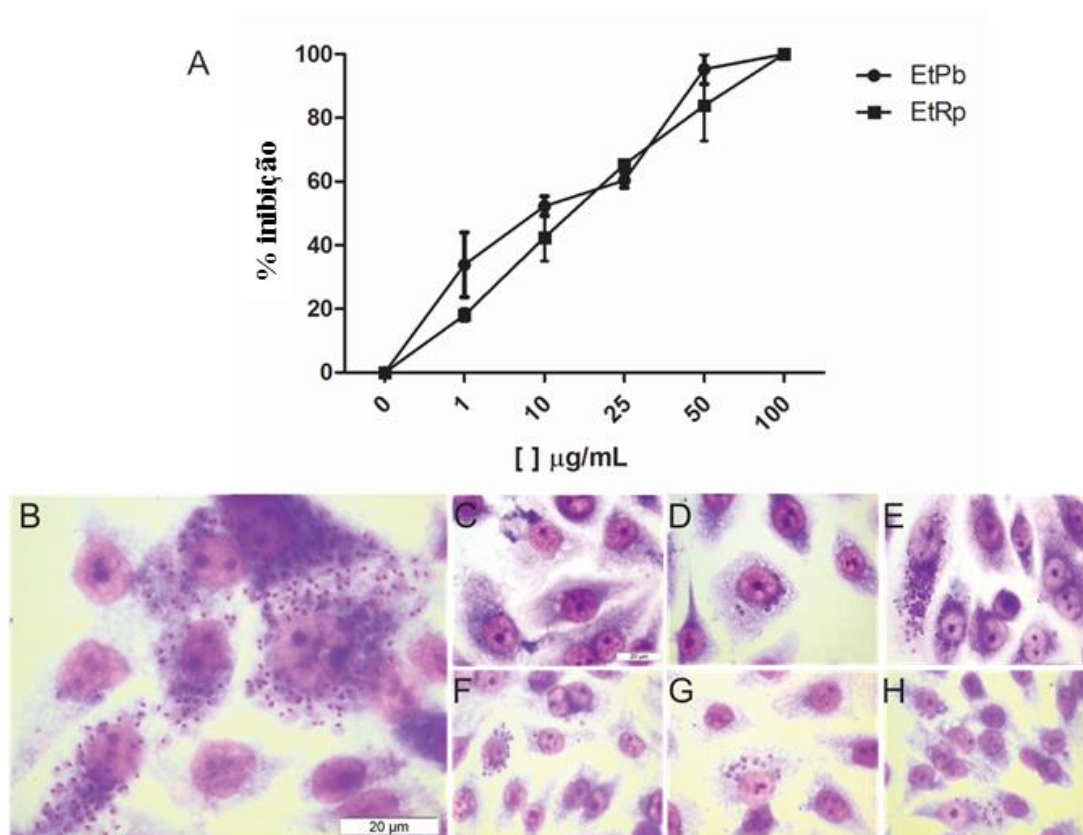


Figura 1- Atividade dos extratos etanólicos dos galhos de *P. bracteata* (EtPb) e *R. peneia* (EtRp) em amastigota intracelular de *T. cruzi*. (A) Porcentagem de inibição dos extratos. (B) Controle. (C-E) EtPb 50, 25 e 10 $\mu\text{g/mL}$. (F-G) EtRp 50, 25 e 10 $\mu\text{g/mL}$.

Apesar de existirem estes e outros resultados sobre potenciais drogas contra *T. cruzi*, poucos estudos demonstram a eficácia dos compostos frente às três formas do ciclo de vida do protozoário (LAZARIN-BIDÓIA *et al.*, 2013; MENNA-BARRETO, *et al.*, 2005). Nos resultados aqui obtidos foi observado que os extratos mais ativos (*R. peneia* e *P. bracteata*) são eficazes contra as formas amastigotas intracelular e tripomastigotas. As amastigotas são um alvo difícil de ser afetado, visto que estão dentro das células do hospedeiro as quais possuem mecanismos de proteção natural contra agentes citotóxicos, assim, as substâncias utilizadas para tratamento devem ser permeáveis à membrana celular do hospedeiro. Sendo esse fator limitante na busca por drogas eficientes contra essa forma. Outro fator que dificulta a obtenção de novos tratamentos para doença de Chagas é a

escassez de estudos *in vivo*, o qual é de grande relevância para o aprofundamento dos resultados *in vitro*, já que podem ser utilizados para validar a atividade dos compostos em condições reais da doença de Chagas (IZUMI et al., 2011).

Sendo assim, decidiu-se em avaliar a atividade dos extratos de *R. peneia* e *P. bracteata* em modelos murinos (BALB/c) infectados com *T. cruzi* a fim de obter dados para possível sugestão de fitoterápicos.

A avaliação da parasitemia diária foi plotada no gráfico e avaliada em todos os grupos: Não tratado, tratado com benznidazol (5 e 100mg/Kg/dia), tratado com *P. bracteata* (CGAA 50 e 200mg/Kg/dia, Figura 2 A) e tratado com *R. peneia* (CNEA 50 e 200mg/Kg/dia, Figura 2 B). Observa-se que a parasitemia diminuiu em todos os grupos tratados. A fim de verificar se a redução era significativa, os dados de parasitemia no oitavo dia após a infecção foram comparados (Figura 3).

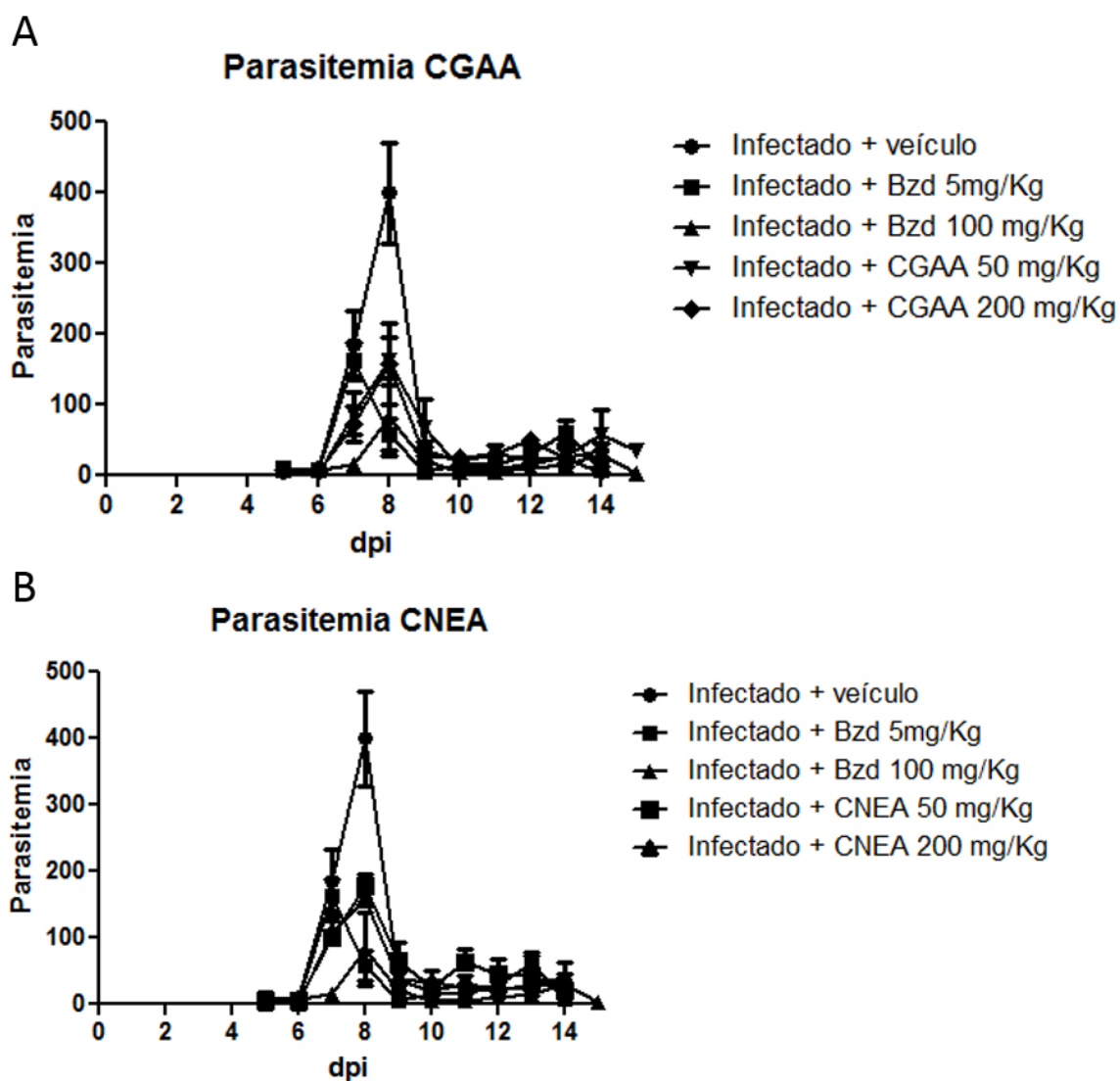


Figura 2- Atividade dos extratos etanólicos dos galhos de *P. bracteata* (CGAA) e *R. peneia* (CNEA) na parasitemia em sangue de camundongos infectados com *T. cruzi*. (A) Parasitemia por 15 dias durante o tratamento com *P. bracteata* e (B) Parasitemia por 15 dias durante o tratamento com *R. peneia*. Ambos os gráficos estão em comparação com os tratados com benznidazol (Bzd).

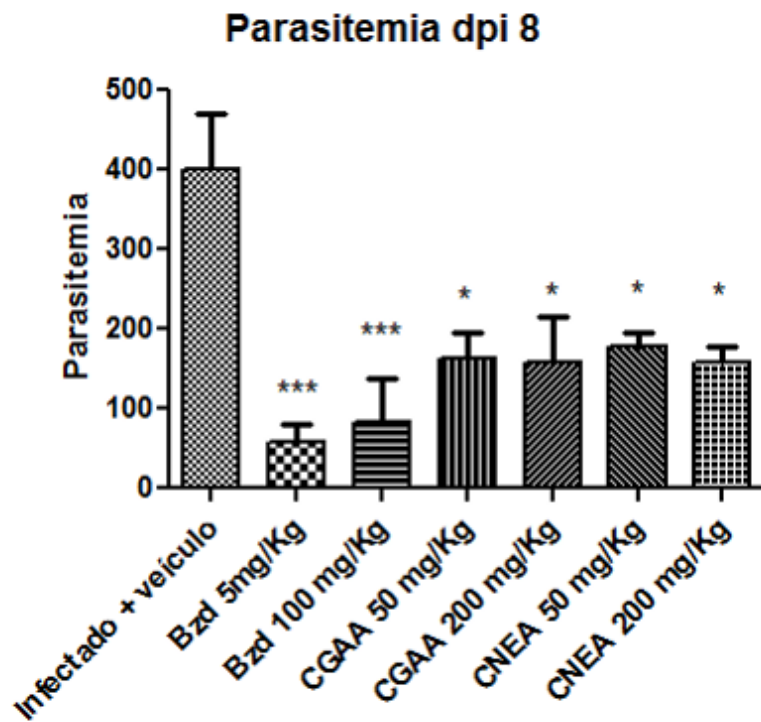


Figura 3 Atividade dos extratos etanólicos dos galhos de *P. bracteata* (CGAA) e *R. peneia* (CNEA) na parasitemia em sangue de camundongos após 8 dias de infecção com *T. cruzi* e tratados com os extratos etanólicos e benznidazol. Observa-se redução significativa na parasitemia sanguínea após o tratamento com ambos os extratos. *** $p < 0,0001$; * $p < 0,005$.

Os gráficos com resultado da parasitemia demonstram que o tratamento reduz a quantidade de tripomastigotas sanguíneas nos camundongos, no entanto, estes estavam debilitados e morreram antes da finalização dos experimentos. Visto isso, foi analisado o peso dos órgãos e a análise histológica do tecido cardíaco, a fim de verificar se a infecção ou o tratamento estariam induzindo outros danos aos animais. Como demonstrado na figura 4, o peso do baço e fígado alterou em relação ao animal não infectado. Sugerindo que a alteração vista é devido a infecção com *T. cruzi*.

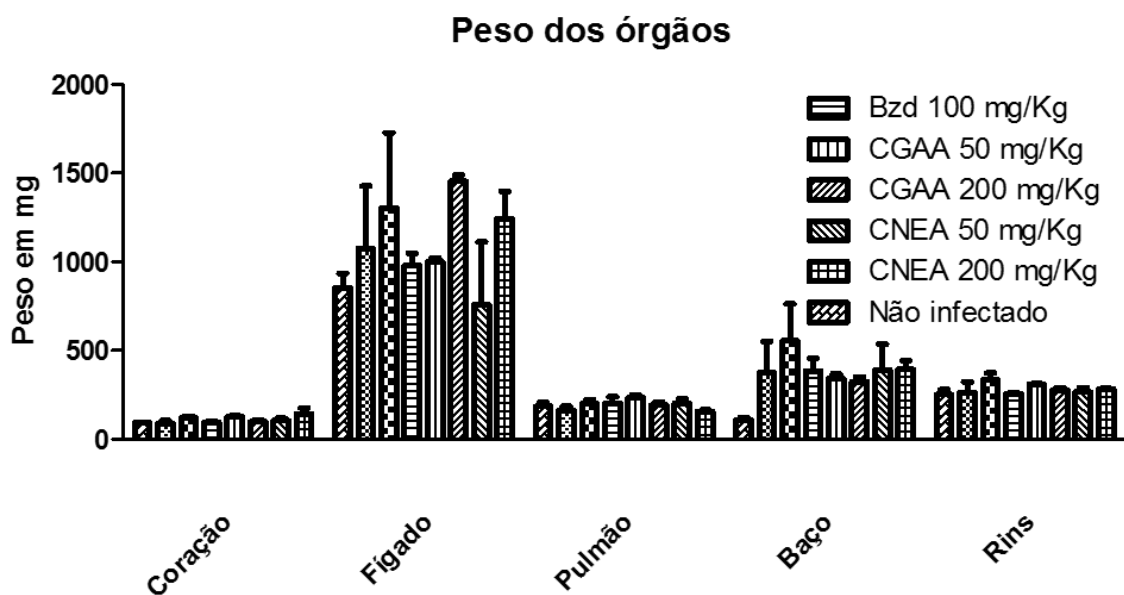


Figura 4- Alteração no peso dos órgãos dos animais infectados e tratados coletados no 15 dia após infecção e 10 dias de tratamento. Observa-se que o fígado e baço foram os órgãos com maior alteração no peso quando comparado ao animal não infectado. *P. bracteata* (CGAA) e *R. peneia* (CNEA) Benznidazol (Bzd).

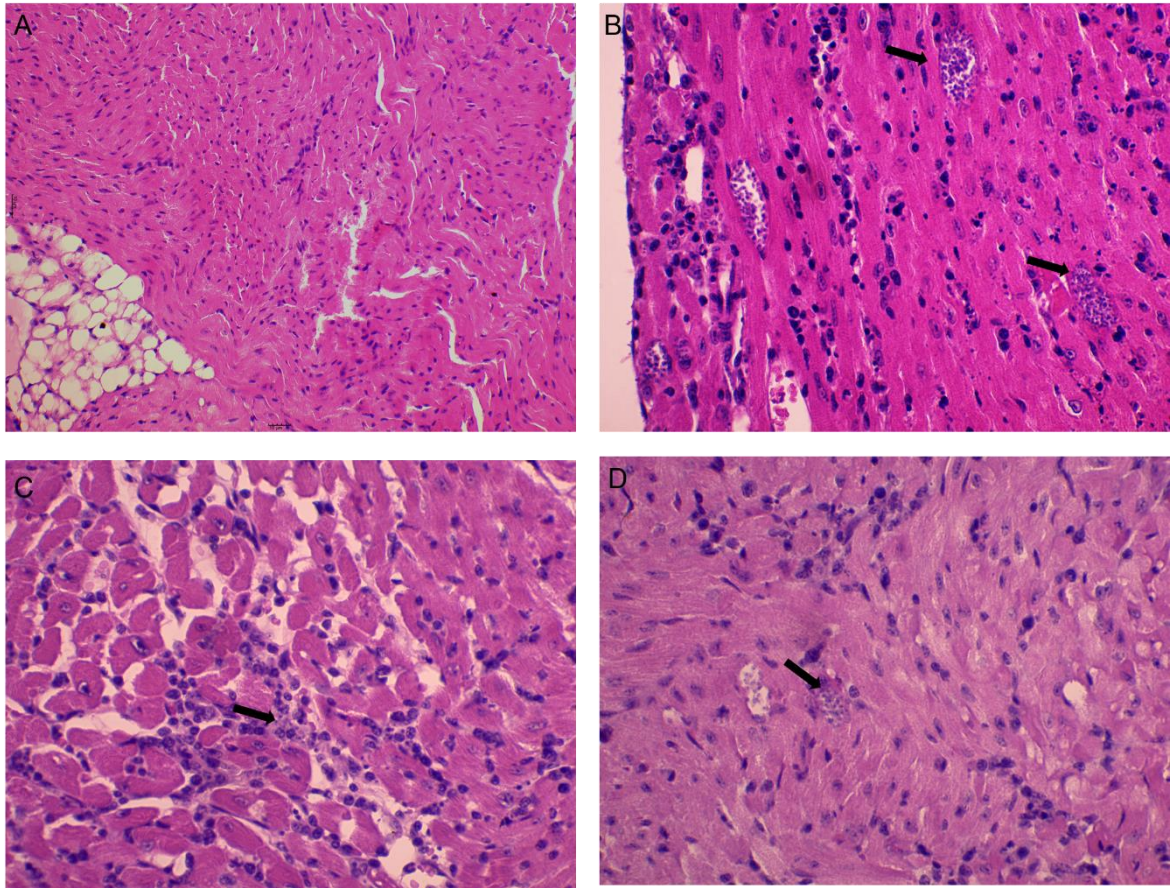


Figura 5- Análise histológica do tecido cardíaco dos animais infectados e tratados coletados no 15 dia após infecção e 10 dias de tratamento. (A): tecido de animal não infectado; (B): tecido de animal infectado e não tratado; (C) Tecido infectado e tratado com 200 mg/kg/dia com extrato de *R. peneia*; (D) Tecido infectado e tratado com 200 mg/kg/dia com extrato de *P. bracteata*. Observa-se ninhos de amastigotas nos tecidos infectados, inclusive nos tratados com a maior concentração dos extratos.

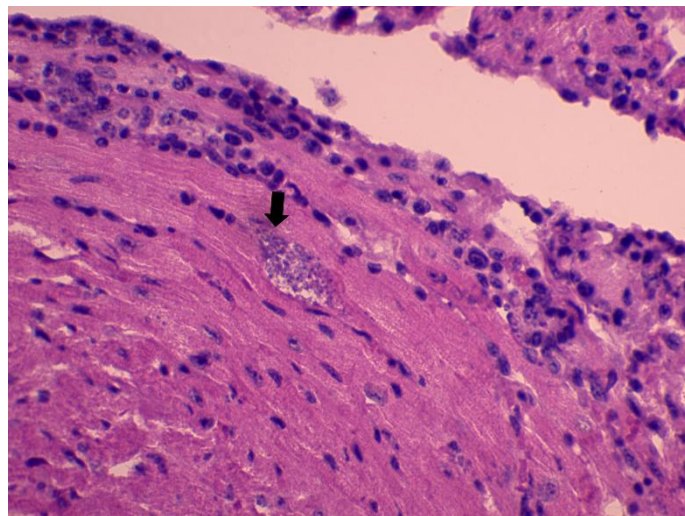


Figura 55- Análise histológica do tecido cardíaco do camundongo infectado e tratado com benznidazol 50mg/kg coletado no 15 dia após infecção e 10 dias de tratamento. Observa-se ninho de amastigotas no tecido, mesmo após o tratamento.

A análise histológica revelou que o tratamento, inclusive com benznidazol (Figura 5 e 6), não eliminou as amastigotas no interior do tecido cardíaco. Os resultados obtidos mostram que o tratamento com os extratos, assim como com o benznidazol foi eficaz somente na forma aguda da doença.

**ANEXO I - PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA DA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ**

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Investigação da atividade in vitro e in vivo de Produtos Naturais da Amazônia em *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi*", protocolada sob o CEUA nº 9414190315, sob a responsabilidade de **Celso Vataru Nakamura** e equipe: *Jean Henrique da Silva Rodrigues; Juliana Cogo; Nilma de Souza Fernandes; Vânia Cristina Desoti; Danielle Lazzarin Bidóia; Tania Ueda Nakamura; Valdir Florêncio Veiga Junior* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Maringá (CEUA/UEM) na reunião de 28/05/2015.

We certify that the proposal "In vitro and in vivo investigation activity of Amazonian Natural Products in *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*", utilizing 78 Isogenics mice (78 females), protocol number CEUA 9414190315, under the responsibility of **Celso Vataru Nakamura** and team; *Jean Henrique da Silva Rodrigues; Juliana Cogo; Nilma de Souza Fernandes; Vânia Cristina Desoti; Danielle Lazzarin Bidóia; Tania Ueda Nakamura; Valdir Florêncio Veiga Junior* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the State University of Maringá (CEUA/UEM) in the meeting of 05/28/2015.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **07/2015 a 12/2016** Área: **Ciências Básicas da Saúde**

Origem: **Biotério Central da UEM**
Espécie: **Camundongos isogênicos** sexo: **Fêmeas** idade: **21 a 21 dias** N: **78**
Linhagem: **Balb/C** Peso: **20 a 25 g**

Resumo: Doenças Tropicais Negligenciadas, por serem um relevante problema de saúde pública, estão atraindo a atenção mundial (WHO, 2010). A doença de Chagas, causada pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*, encontrada em 21 países, afeta cerca de 8 milhões de pessoas com uma incidência de aproximadamente 50.000 novos casos por ano (WHO, 2012). América Latina concentra maior número de casos da doença de Chagas que se tornou problema mundial de saúde em decorrência da migração para países não endêmicos, afetando Austrália, Europa, USA e Canadá, resultando em custo de tratamento anual de aproximadamente \$ 600 milhões (Schmunis, 2010) (Lee, 2013). A patogênese da doença de Chagas subdivide-se em fase aguda, caracterizada por inflamações inespecíficas, seguida de fase indeterminada assintomática ou progressão para fase crônica, onde cerca de 30-40% dos casos desenvolve lesões cardiovasculares, gastrointestinais e neurológicas irreversíveis (Barret, 2003) (Rassi, 2012). Tradicionalmente, a transmissão da doença de Chagas ocorre por do contágio com fezes/urina contaminadas de insetos da subfamília Triatominae (Hemiptera, Reduviidae), entretanto pode decorrer de transfusão sanguínea, transmissão congênita e oral (alimentos contaminados) (Rassi, 2010) (Lescure, 2010). A Leishmaniose é endêmica em 98 países em todo mundo, com cerca de 350 milhões de pessoas em risco de contágio e 12 milhões de pessoas infectadas atualmente. Provocada por mais de 20 espécies do protozoário *Leishmania* sp suas manifestações clínicas subdividem-se em cutânea, mucocutânea e visceral. A Leishmaniose cutânea é a forma clínica mais comum com 1,5 milhões de novos casos por ano, as espécies que se destacam no Novo Mundo são *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. guyanensis* (Herwaldt, 1999) (Murray, 2005) (WHO, 2012). Dentre os casos mundiais de Leishmaniose cutânea 70 a 75% concentram-se em 10 países, dentre estes se encontra o Brasil, com cerca de 30.000 casos somente em 2010 (Alvar, 2012) (Voules, 2013). A transmissão ocorre pela picada da fêmea de flebotomíneo, no Novo Mundo o vetor é *Phlebotomus* e no Velho Mundo *Lutzomyia* (Goto, 2012). As manifestações clínicas caracterizam-se por lesões únicas ou múltiplas geralmente localizadas em pernas, braços e cabeça, inicialmente como pápulas, progridem para nódulo até atingirem lesão ulcerosa (Ilveira, 2005) (Olliaro, 2013). Atualmente, compostos nitroderivados como Benzonidazol e Nifurtimox são responsáveis pelo tratamento da Doença de Chagas, apesar da reduzida eficácia na fase crônica da patologia e reações adversas em cerca de 40% dos pacientes (Buckner, 2010) (Izumi, 2011) (Menezes, 2011). Já para tratamento antileishmania, os antimoniais pentavalentes (antimoniato de meglumina e estibogluconato de sódio) são o tratamento de primeira linha, como segunda linha estão a anfotericina B, pentamidina e miltefosina. (Reithinger, 2007) (Oliveira, 2011) (Tiunan, 2011). Contudo, para ambas as doenças o tratamento apresenta severos efeitos colaterais, longo tempo de tratamento e variabilidade na eficácia, fatores que fomentam a busca por novas alternativas terapêuticas (Barret, 2012). De acordo com SINGH (2012), a Organização Mundial de Saúde estima que medicamentos fitoterápicos e tradicionais derivados principalmente de plantas, constituem aproximadamente 80% do cuidado primário a pacientes em todo o mundo. Cerca de 50% das drogas mais prescritas nos Estados Unidos consistem



APÊNDICE C

Artigo publicado com partes dos resultados apresentados na tese.

Atividade *in vitro* de extratos de *Ocotea* em *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis*¹

Nilma de Souza Fernandes², Vânia Desoti³, Celso Vataru Nakamura⁴, Valdir

Florêncio da Veiga Junior⁵ Submetido 01/06/2015 – Aceito

29/04/2016 – Publicado on-line 01/05/2016

RESUMO

Os protozoários parasitos *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania amazonensis* são agente etiológicos da doença de Chagas e leishmaniose, respectivamente. Considerando-se que as opções terapêuticas disponíveis atualmente para o tratamento de infecções causadas por esses parasitos têm severos efeitos colaterais e baixa eficácia, a busca por novos agentes quimioterapêuticos eficazes e menos tóxicos é extremamente importante para o tratamento dessas doenças que afetam milhões de pessoas em países subdesenvolvidos e em desenvolvimento. No sentido de buscar substâncias bioativas de plantas com potencial para uma nova droga, foi realizada varredura *in vitro* utilizando extratos etanólicos de 3 espécies do gênero *Ocotea* (*Lauraceae*) contra *T. cruzi* e *L. amazonensis*. O extrato de folhas de *O. ceanothifolia* apresentou melhor resultado, com CE₅₀ de 16,6 µg/mL para tripomastigotas de *T. cruzi* e 34,5 µg/mL para promastigotas de *L. amazonensis*, indicando que *O. ceanothifolia* é uma espécie com promissora fonte de substâncias anti-*T. cruzi* e anti-*Leishmania*.

Palavras-chave: Doenças negligenciadas, Produtos naturais, Lauraceae

***In vitro* activity of *Ocotea* extracts in *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*.** Protozoan parasites *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania amazonensis*

¹ Parte da tese de doutorado no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia do primeiro autor junto à Universidade Federal do Amazonas

² Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas - Av. Gal. Rodrigo Octávio, 3.000, Coroado II, Manaus, Amazonas. Email: nilma.fernandes@gmail.com.br

³ Doutoranda do Programa de Pós-graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Maringá - Departamento de Ciências Básicas da Saúde. Av. Colombo, 5790 - Zona 7, Maringá, Paraná. Email: vaniadesoti@gmail.com

⁴ Professor associado da Universidade Estadual de Maringá - Departamento de Ciências Básicas da Saúde. Av. Colombo, 5790-Zona 7, Maringá, Paraná. Email: cvnakamura@uem.br

⁵ Professor Associado da Universidade Federal do Amazonas – Departamento de Química, ICE, Av. Gal. Rodrigo Octávio, 3.000, Coroado II, Manaus, Amazonas. E-mail: valdirveiga@ufam.edu.br



are etiologic agents of Chagas' disease and leishmaniasis, respectively. These diseases affect millions people in underdeveloped and developing countries. Considering that current therapeutic options available for treatment of these infections have severe side effects and low efficacy, the search for new effective and less toxic chemotherapeutic agents is extremely important. In order to find bioactive substances of plants with potential for new drug, we performed an *in vitro* scan using ethanolic extracts of three species of the genus *Ocotea* against *T. cruzi* and *L. amazonensis*. *O. ceanothifolia* leaves extract showed better results, with EC50 of 16.6 mg / mL for *T. cruzi* trypomastigotes and 34.5 mg / mL for *L. amazonensis* promastigotes. Thus, these results indicate that *O. ceanothifolia* is a promising source of substances with anti-*T. cruzi* and anti-Leishmania activities.

Key words: Neglected diseases, Natural products, Lauraceae

1. INTRODUÇÃO

Os tripanosomatídeos *Leishmania amazonensis* e *Trypanosoma cruzi* são agentes etiológicos da leishmaniose e da doença de Chagas, respectivamente. São doenças infecciosas que afetam milhões de pessoas em todo mundo (WHO, 2015a, 2015b). O controle dessas parasitoses é dificultado pelas limitações dos medicamentos usados no tratamento, pelo alto custo financeiro, bem como pela ausência de vacina eficaz (MURRAY et al., 2005; REITHINGER et al., 2007).

Atualmente, a quimioterapia para ambas as doenças tem baixa eficácia e severos efeitos colaterais, levando ao abandono do tratamento e resistência das cepas (CARDOSO et al., 2014; MAYA et al., 2010; RASSI, 2012). Este cenário mostra a necessidade de desenvolver terapias que inibiam a multiplicação e/ou transmissão de agente etiológicos das doenças negligenciadas sem causar severos efeitos colaterais aos pacientes (COURA; DIAS, 2009; ROY et al., 2012).

Plantas medicinais têm sido amplamente utilizadas para o tratamento de doenças parasitárias. Inúmeras pesquisas demonstram que produtos provenientes de plantas tem potencial terapêutico, inclusive com propriedades anti-tripanosomatídeos (ALVES et al., 2012; IZUMI et al., 2011; SCHMIDT et al., 2012).

O gênero *Ocotea* Aubl. é um dos maiores da família *Lauraceae*, com aproximadamente 320 espécies distribuídas principalmente na região subtropical das Américas. É o gênero mais estudado da família e com grande variedade de atividades biológicas reconhecidas (MARQUES, 2001; YAMAGUCHI, et al., 2013).

As espécies *O. ceatnothifolia*, *O. nigrescens* e *O. leucoxyton* apresentam poucos estudos quanto às características químicas e atividades biológicas. Foi demonstrado que o óleo essencial de *O. nigrescens* tem atividade anti-agregação plaquetária (YAMAGUCHI, et al., 2013). Ainda, foi relatada a atividade antioxidante e anticolinesterásica dos extratos etanólicos das três espécies em trabalho anterior do nosso grupo (YAMAGUCHI; ALCÂNTARA; VEIGA JUNIOR, 2012). Quanto à *O. leucoxyton* foi isolado o alcaloide aporfínico dicentrinona, um inibidor da enzima topoisomerase (ZHOU et al., 2000).

Visto a ausência de informações sobre as espécies de *Ocotea* e o potencial bioativo já relatado para os extratos do gênero, este trabalho avaliou a atividade dos extratos etanólicos de folhas e galhos de *O. ceatnothifolia*, *O. nigrescens* e *O. leucoxyton* frente à *T. cruzi* e *L. amazonensis*.

2. MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Material vegetal e produção do extrato

Duas espécies do gênero *Ocotea* foram coletadas na Reserva Florestal Ducke (*Ocotea ceatnothifolia* (Nees) Mez, *Ocotea leucoxyton* (Sw.) Laness) e uma no campus da Universidade Federal do Amazonas

(*Ocotea nigrescens* Vicent), identificados no projeto Flora da Reserva Ducke, identificados pelo Dr. Alberto Vicentini, do INPA.

As folhas e galhos foram limpos e secos em estufa de ar circulante. Em seguida, foram triturados e 300 g de material triturado foi submetido à extração em etanol utilizando aparelho Soxhlet por 24 horas. Após a extração, o material foi filtrado em papel de filtro e concentrado em rotaevaporador, 50 °C, até a evaporação do solvente.

2.2 Atividade anti-*T. cruzi* e anti-*L. amazonensis*

Os experimentos foram realizados com a cepa Y de *T. cruzi*. Formas epimastigotas de *T. cruzi* foram mantidas em cultura axênica a 28 °C em meio LIT B (*liver infusion tryptose*), pH 7,4 suplementando com 10% de soro fetal bovino inativado. Formas tripomastigotas foram obtidas do sobrenadante de células LLCMK₂ (células de rim de macaco - *Macaca mulata*) previamente infectadas em de *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM) suplementado com 2 mM L-glutamina, 10% FBS, 50 mg/l gentamicina e bicarbonato de sódio. Foram mantidos em estufa com 5%

CO₂, a 37 °C.

Para ensaios com promastigotas de *L. amazonensis* foi utilizada a cepa MHOM/BR/Josefa. Os protozoários foram mantidos em meio Warren a 25 °C [*brainheart infusion* com hemina (10 µg/mL) e ácido fólico (10 µg/mL), pH 7,2] suplementado com 10% de soro fetal bovino inativado (FBS; Gibco Invitrogen, New York, NY, USA).

Para avaliar a atividade dos extratos as formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram ressuspensas em meio DMEM suplementando com 10% de soro fetal bovino na concentração de 2×10^7 parasitos/mL. A suspensão foi adicionada em placa de 96 poços. Os extratos foram diluídos em DMSO e DMEM no dobro da concentração desejada: 10, 100, 500 e 1000 µg/mL e adicionados na placa que foi incubada por 24 h a 37 °C. A concentração efetiva para 50% dos parasitos (CE₅₀) foi determinada após contagem em microscópio óptico de 50 campos aleatórios.

Para avaliação da inibição de proliferação das formas epimastigotas de *T. cruzi* e promastigotas de *L. amazonensis*, 1×10^6 células/mL de parasitos foram inoculados de em meio de cultura suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), em placas de 24 poços na presença dos extratos diluídos em DMSO a 1%, nas concentrações de 10, 50, 100, 500 e 1000 µg/mL. As placas foram incubadas por 96 horas (epimastigotas) ou 72 horas (promastigotas) a 28 °C. Após a incubação foi realizada contagem em câmara de Neubauer das amostras diluídas em formalina. A concentração que inibe a proliferação de 50% dos protozoários (CI₅₀) foi determinada por análise de regressão logarítmica. A citotoxicidade foi avaliada em células LLCMK₂ utilizando o ensaio de viabilidade celular através da redução do MTT. $2,5 \times 10^5$ células/mL em meio DMEM suplementado com 10% de SFB foram cultivadas em placas de 96 poços e mantidas a 37 °C e 5% de CO₂ por 24 horas. Posteriormente, os extratos foram adicionados em concentrações crescentes: 10, 50, 100, 500 e 1000 µg/mL e a placa incubada durante 96 horas. Após o tratamento, as células foram lavadas com PBS e incubadas na presença de MTT (2 mg/mL), após 4 horas os cristais de formazan foram solubilizados em DMSO e a leitura da absorbância realizada a 492 nm em um espectrofotômetro de placas (Bio Tek– Power Wave XS). A concentração citotóxica para 50% (CC₅₀) foi determinada por análise de regressão logarítmica. O índice de seletividade foi calculado comparando a citotoxicidade em células de mamífero com a atividade antiprotozoário: CC₅₀/CE₅₀ ou CC₅₀/CI₅₀.

3. RESULTADOS

Os extratos etanólicos foram avaliados em tripomastigotas, a forma não multiplicativa e infectiva de *T. cruzi*. Dentre os extratos etanólicos das três espécies de *Ocotea*, os de folhas de *O. ceanothifolia* e galhos de *O. guianensis* foram considerados ativos com CE_{50} abaixo de 50 $\mu\text{g/mL}$ frente à tripomastigotas: *O. ceanothifolia* (16,6 $\mu\text{g/mL}$) e *O. guianensis* (31 $\mu\text{g/mL}$). Visto a atividade dos dois extratos frente à tripomastigotas, estes foram testados frente à forma epimastigota, forma multiplicativa encontrada no inseto vetor. A atividade inibitória de crescimento de 50% dos parasitos (CI_{50}) foi avaliada após 96 horas de tratamento. A atividade dos extratos testados foi menor em epimastigotas em comparação aos resultados em tripomastigotas (Tabela 1).

A fim de avaliar o índice de seletividade dos dois extratos mais ativos a citotoxicidade em LLCMK₂ foi comparada com a atividade anti-protozoário. O extrato de *O. ceanothifolia* foi 5,4 vezes mais ativo em tripomastigotas e 1,4 vezes mais ativo em epimastigotas. Já o extrato de *O. guianensis* tem índice de seletividade de 3,5 e 1,7 para tripomastigotas e epimastigotas, respectivamente. Os resultados indicam que os extratos tem maior toxicidade para os parasitos quando comparados com células de mamífero.

Os ensaios demonstram mostram que as formas tripomastigotas foram mais

susceptíveis ao tratamento com os extratos. *et al.*, 2011; *et al.*, 2011; Alguns autores sugerem que a diferença de IZUMI *et al.*, 2010; sensibilidade aos tratamentos é devido a PELIZZARO-ROCHA fatores morfológicos, bioquímicos e SOUZA, W., 2009). genéticos dos protozoários (GONÇALVES

Tabela 1 - Atividade citotóxica dos extratos etanólicos de folhas e galhos em formas tripomomastigotas e epimastigotas de *T. cruzi*. Os resultados estão em concentração responsável pela inibição do crescimento ou viabilidade dos parasitos em 50%. Os valores de CC_{50} são referentes à atividade em linhagem celular LLCMK₂. NR: não realizado. DP: desvio padrão. IS_{tr} : índice de seletividade tripomastigotas. IS_{ep} : índice de seletividade epimastigotas.

| Espécies | Parte da planta | Tripomastigota | | Epimastigota | |
|-------------------------|-----------------|-----------------------------------|-----------------------------------|--------------|-----------|
| | | CE_{50} $\mu\text{g/mL} \pm DP$ | CI_{50} $\mu\text{g/mL} \pm DP$ | IS_{tr} | IS_{ep} |
| <i>O. ceanothifolia</i> | Folhas | 16,6 \pm 1,2 | 62,8 \pm 4,8 | 5,4 | 1,4 |
| <i>O. ceanothifolia</i> | Galhos | 221,4 \pm 20,1 | NR | | |
| <i>O. guianensis</i> | Folhas | 80,5 \pm 29,3 | NR | | |
| <i>O. guianensis</i> | Galhos | 31,0 \pm 1,4 | 63,0 \pm 9,8 | 3,5 | 1,7 |
| <i>O. nigrescens</i> | Folhas | 202,4 \pm 3,4 | NR | | |
| <i>O. nigrescens</i> | Galhos | 216,0 \pm 12,7 | NR | | |

Vários trabalhos utilizando extratos e óleo essencial de diferentes famílias de plantas demonstraram atividade antiprotozoário (ALVIANO *et al.*, 2012; BERGER *et al.*, 2001; FOURNET *et al.*, 1993; MENNA-BARRETO *et al.*, 2008; RODRIGUES *et al.*, 2014; SCHINOR *et al.*, 2007; SCHMIDT *et al.*, 2012; TEMPONE *et al.*, 2005). A varredura

utilizando diversas famílias da flora brasileira, como *Annonaceae*, *Apiaceae*, *Cucurbitaceae*,

Lamiaceae, *Lauraceae*, *Moraceae*, *Nyctaginaceae* e *Verbenaceae* demonstrou que o extrato etanólico dos frutos de *Ocotea paranapiacabensis* (*Lauraceae*) *Aegiphila Ihotzkiana* (*Lamiaceae*) são ativos frente às formas epimastigotas de *T. cruzi* (ALVES et al., 2012). Duas neolignanas isoladas de *Nectandra lineata* e dois alcaloides isolados de *N. megapotamica* também inibiram o crescimento deste protozoário (SANTOSFILHO; SARTIS 1980).

Os extratos de *Ocotea* ainda foram avaliados em *L. amazonensis* (Tabela 2). O extrato de folhas de *O. ceanothifolia* foi mais ativo, com CI_{50} de 34,5 µg/mL.

Tabela 2 - Atividade citotóxica dos extratos etanólicos em promastigota de *L. amazonensis*. Os valores representam a concentração do extrato responsável pela inibição de 50% da proliferação do parasito. DP: desvio padrão.

| <i>L. amazonensis</i> promastigotas | | |
|-------------------------------------|------------------------|--|
| <u>Espécies</u> | <u>Parte da planta</u> | <u>CI_{50} µg/mL±DP</u> |
| <i>O. ceanothifolia</i> | folhas | 34,5±9,1 |
| <i>O. ceanothifolia</i> | galhos | 61,6±2,3 |
| <i>O. guianensis</i> | folhas | 547,5±67 |
| <i>O. guianensis</i> | galhos | 80,0±35,3 |
| <i>O. nigrescens</i> | folhas | 101,0±19,7 |
| <i>O. nigrescens</i> | galhos | 322,5±24,7 |

Várias substâncias provenientes de espécies de *Lauraceae* possuem atividade anti-leishmania. Extratos de *O. lancifolia* e *A. canelilla* tem atividade *in vitro* frente à

Leishmania e *T. cruzi* (FOURNET; BARRIOS; MUÑOZ, 1994; FOURNET et al., 2007; SILVA et al., 2009). Lignanas de *N. megapotamica* e *O. duckei* também apresentaram atividade contra o protozoário (DA SILVA FILHO et al., 2008; MONTE NETO et al., 2007). Sánchez-Suárez e colaboradores (2011) demonstraram que substâncias, principalmente lignanas, extraídas de *O. macrophylla* e *P. cinereum* possuem atividade frente à *L. panamensis* e *L. braziliensis*, embora os extratos brutos destas espécies não tenham demonstrado atividade contra estes protozoários. Este resultado sugere a presença de substâncias com atividade antagônica nos extratos, o que poderia explicar a diminuição de atividade destes em relação à substâncias isoladas (SÁNCHEZ-SUÁREZ et al., 2011).

Observa-se nos resultados obtidos que o extrato das folhas de *O. ceanothifolia* são mais ativos frente *T. cruzi* e *L. amazonensis*, sendo promissor para a avaliação do mecanismo de ação e identificação das substâncias ativas.

4. CONCLUSÃO

Os extratos etanólicos obtidos a partir de espécies do gênero *Ocotea*, principalmente de *O. ceanothifolia*, são promissores para melhor avaliação da atividade anti-

tripanosomatídeos. O extrato de *O. ceanothifolia* pode ser utilizado para determinação e isolamento das substâncias ativas e avaliação do mecanismo de ação destas em *T. cruzi* e *L. amazonenses*.

Agradecimentos

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico. (CNPq), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM).

Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. Os autores e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

Na Referências

- ALVES, R. T. et al. Trypanocidal activity of Brazilian plants against epimastigote forms from Y and Bolivia strains of *Trypanosoma cruzi*. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 22, n. 3, p. 528–533, 2012.
- ALVIANO, D. S. et al. Conventional therapy and promising plant-derived compounds against trypanosomatid parasites. **Frontiers in microbiology**, v. 3, n. August, p. 1–10, jan. 2012.
- BERGER, I. et al. Antiprotozoal activity of *Neurolaena lobata*. **Phytotherapy Research**, v. 15, p. 327–330, 2001.
- CARDOSO, E. A. et al. Leishmaniasis : History , Evolution of Treatment and the Need for New Drugs. **Current Biotechnology**, 2014.
- COURA, J. R.; DIAS, J. C. P. Epidemiology, control and surveillance of Chagas disease: 100 years after its discovery. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104 Suppl, p. 31–40, 2009.
- DA SILVA FILHO, A. A. et al. *In vitro* antileishmanial and antimalarial activities of tetrahydrofuran lignans isolated from *Nectandra megapotamica* (Lauraceae). **Phytotherapy Research**, v. 22, n. December 2007, p. 1307–1310, 2008.
- FOURNET, A. et al. Antiprotozoal activity of dehydrozaluzanin C, a sesquiterpene lactone isolated from *Munnozia maronii* (asteraceae). **Phytotherapy Research**, v. 7, p. 111– 115, 1993.
- FOURNET, A. et al. Phytochemical and antiprotozoal activity of *Ocotea lancifolia*. **Fitoterapia**, v. 78, p. 382–384, 2007.
- FOURNET, A.; BARRIOS, A. A.; MUÑOZ, V. Leishmanicidal and trypanocidal activities of Bolivian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 41, p. 19–37, 1994.
- GONÇALVES, R. L. S. et al. A comparative assessment of mitochondrial function in epimastigotes and bloodstream trypomastigotes of *Trypanosoma cruzi*. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 43, p. 651–661, 2011.
- IZUMI, E. et al. Natural products and Chagas' disease: a review of plant compounds studied for activity against *Trypanosoma cruzi*. **Natural product reports**, v. 28, n. 4, p. 809–23, abr. 2011.
- MARQUES, C. A. Importância Econômica da Família Lauraceae. **Floresta e Ambiente**, v. 8, p. 195–206, 2001.

- MAYA, J. D. et al. Chagas disease: Present status of pathogenic mechanisms and chemotherapy. **Biological Research**, v. 43, p. 323–331, 2010.
- MENNA-BARRETO, R. F. S. et al. Anti *Trypanosoma cruzi* activity of *Pterodon pubescens* seed oil: geranylgeraniol as the major bioactive component. **Parasitology research**, v. 103, n. 1, p. 111–7, jun. 2008.
- MONTE NETO, R. L. et al. Crude ethanolic extract, lignoid fraction and yangambin from *Ocotea ducket* (Lauraceae) show antileishmanial activity. **Zeitschrift fur Naturforschung - Section C Journal of Biosciences**, v. 62, p. 348–352, 2007.
- PELLIZZARO-ROCHA, K. J. et al. Synergistic effects of parthenolide and benznidazole on *Trypanosoma cruzi*. **Phytomedicine**, v. 18, p. 36–39, 2010.
- RASSI, A.; MARCONDES DE REZENDE, J. American trypanosomiasis (Chagas disease). **Infectious disease clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 275–91, 2012.
- REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet infectious diseases**, v. 7, p. 581–596, 2007.
- RODRIGUES, I. A. et al. *Arrabidaea chica* hexanic extract induces mitochondrion damage and peptidase inhibition on *Leishmania* spp. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 7, 2014.
- ROY, P. et al. Biological targeting and drug delivery in control of Leishmaniasis. v. 6, n. 6, p. 73–87, 2012.
- SÁNCHEZ-SUÁREZ, J. et al. Leishmanicidal and cytotoxic activities of extracts and naturally-occurring compounds from two Lauraceae species. **Natural product communications**, v. 6, n. 2, p. 231–234, 2011.
- SCHINOR, E. C. et al. Effect of extracts and isolated compounds from *Chresta scapigera* on viability of *Leishmania amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, v. 43, p. 295300, 2007.
- SCHMIDT, T. J. et al. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases - part I. **Current medicinal chemistry**, v. 19, n. 14, p. 2128–75, jan. 2012.
- SILVA, J. R. A. et al. Chemical and biological evaluation of essential oils with economic value from lauraceae species. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, n. 6, p. 1071–1076, 2009.
- SOUZA, W. DE. Structural organization of *Trypanosoma cruzi*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, n. May, p. 89–100, 2009.
- TEMPONE, A. G. et al. Antiprotozoal activity of Brazilian plant extracts from isoquinoline alkaloid-producing families. **Phytomedicine**, v. 12, n. 5, p. 382–390, 2005.
- World Health Organization. **Leishmaniasis - Fact sheet N°375**, 2015a.
- World Health Organization. **Chagas disease (American trypanosomiasis) - Fact sheet N°340**, 2015b.
- YAMAGUCHI, K. et al. Chemical Composition and Platelet Aggregation Activity of Essential Oils of Two Species of the Genus *Ocotea* (Lauraceae). **Journal of Essential Oil Bearing Plants**, v. 16, n. 4, p. 518–523, 4 jul. 2013.
- YAMAGUCHI, K.; ALCÂNTARA, J.; VEIGA JUNIOR, V. F. DA. Investigação do potencial antioxidante e anticolinester sico de 20 espécies da família Lauraceae. **Acta Amazonica**, v. 42, n. 4, p. 541–546, 2012.
- ZHOU, B. N. et al. Isolation and biochemical characterization of a new topoisomerase I inhibitor from *Ocotea leucoxyllon*. **Journal of Natural Products**, v. 63, n. 2, p. 217– 221, 2000.

