

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA E
BIOCIÊNCIAS

Danielle Tocantins Moura Costa

Transfecção integrativa do gene da β -galactosidase em três espécies de *Leishmania* e padronização de ensaio colorimétrico para triagem de compostos leishmanicida utilizando *Leishmania (V.) braziliensis*

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências da Universidade Federal de Santa Catarina, como requisito parcial para obtenção do Grau de Mestre em Biotecnologia e Biociências.

Orientador: Prof. Dr. Mário Steindel
Florianópolis, 2015

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Costa, Danielle Tocatins Moura
Transfecção integrativa do gene da 7-galactosidase em
três espécies de Leishmania e padronização de ensaio
colorimétrico para triagem de compostos leishmanicida
utilizando Leishmania (V.) braziliensis / Danielle
Tocatins Moura Costa ; orientador, Mario Steindel -
Florianópolis, SC, 2015.
111 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa
Catarina, Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós
Graduação em Biotecnologia e Biociências.

Inclui referências

1. Biotecnologia e Biociências. 2. Leishmaniose. 3. b
galactosidase. 4. Leishmania (V.) braziliensis. 5. Ensaio
colorimétrico. I. Steindel, Mario . II. Universidade
Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em
Biotecnologia e Biociências. III. Título.

"Transfecção integrativa do gene da β -galactosidase em três espécies de *Leishmania* e padronização de ensaio colorimétrico para triagem de compostos leishmanicida utilizando *Leishmania (V.) braziliensis*"

Por

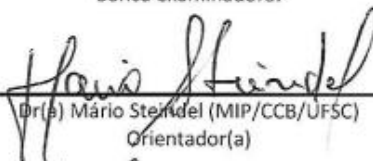
Danielle Tocantins Moura Costa

Dissertação julgada e aprovada em sua forma final pelos membros titulares da Banca Examinadora (020/PPGBTC/2015) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências - UFSC.



Prof(a). Dr(a). Oscar Bruna Romero
Coordenador(a) do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia e Biociências

Banca examinadora:



Dr(a) Mário Steinidel (MIP/CCB/UFSC)
Orientador(a)



Dr(a) Luiz Claudio Miletti (CCA/UEDESC)



Dr(a) Guilherme Razzera Maciel (BQA/CCB/UFSC)



Dr(a) Claudia Maria Oliveira Simões (CIF/CCS/UFSC)

Florianópolis, 05 de novembro de 2015.

Às mulheres da minha família,
batalhadoras e destemidas.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus, primeiramente, pelo dom da vida e todas as outras dádivas que recebo todos os dias.

À minha mãe Fátima e à minha tia Valclêdes, pelo apoio em todos os dias da minha vida, pelo exemplo de força, coragem e determinação.

À minha avó Marcelina que juntamente com minha mãe e minha tia, ainda não descobriram o que é que um biomédico faz.

Aos primos Mazé Moura, Ori Moura e Regina Moura pelo apoio, ajuda e exemplo no mundo acadêmico. Os doutores da família.

Ao Prof. Dr. Mário Steindel pela orientação nesses dois anos de mestrado que me permitiram novos aprendizados e evolução pessoal.

À Prof. Dra. Patrícia Hermes Stoco pela consideração e amizade e ajuda na parte de biologia molecular, sem a qual esse trabalho não seria possível.

Ao Prof. Dr. Edmundo Carlos Grisard e Prof. Dr. Álvaro José Romanha, por todas as dicas e idéias que me deram ao longo do percurso.

Aos colegas de laboratório Dra. Aline Schindwein, Dra. Ibeth Romero e Dr. Jair Tellez que em apoiaram, me ajudaram e tiraram muitas dúvidas ao longo de todo o processo.

Aos colegas de laboratório Greicy Malaquias, Ana Paula Nascimento, Ingrid Botelho, Carine Moreira, Tatiana Catecati e Gustavo Campagnaro pela amizade, companheirismo, que choravam as pitangas junto comigo quando nada dava certo e se alegravam quando as coisas começavam a funcionar.

Ao Maiko Tonini, que me ensinou a cuidar dos parasitos e a fazer as infecções com *Leishmania* em THP-1 em pleno domingo de manhã.

A todos os outros colegas da PROTO, do LIA e do LVA pela presença, amizade, conversas de corredor, ajudas aleatórias, opiniões na sala de lavação e discussões sobre todos os assuntos que vinham à mente.

Ao pessoal do LAMEB, Vanessa, Dênis e Bibiana que fizeram todas as minhas leituras no TECAN e já até sabiam que meu horário era o primeiro do dia.

Às divas Íris, Mariana Rangel e Mariana Maraschin, Roniele, Adara e Bianca pela amizade, ajuda, seminários compartilhados, jantares, conversas aleatórias, piadas, insatisfações farmacológicas, conversas infinitas no Zapzap. A experiência não seria completa sem vocês.

Aos meus irmãos de coração Dérick Gustavo e Guilherme Portela. Estamos juntos desde o ESMG até hoje.

Por fim, a todos os que me ajudaram nessa trajetória, especialmente ao meu pai, Heleno Costa, que torce pelo meu sucesso profissional e pessoal.

Muito Obrigada. Que Deus nos proteja sempre!

“E ainda que tivesse o dom de profecia, e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência, e ainda que tivesse toda a fé, de maneira tal que transportasse os montes, e não tivesse amor, nada seria.”

1 Corintios 13: 2

RESUMO

As leishmanioses afetam cerca de 12 milhões de pessoas e constituem um problema de saúde mundial. Faz-se necessário o desenvolvimento de metodologias para o estudo de novas entidades químicas ativas contra a doença e que sejam menos laboriosas, mais rápidas, sensíveis e compatíveis com a automação. No presente trabalho, realizou-se a transfecção de forma integrativa do gene da β -galactosidase em três espécies de *Leishmania* (*L. (L.) infantum*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*) com o objetivo de padronizar um ensaio colorimétrico rápido e sensível para triagem de compostos contra amastigotas intracelulares de *L. (V.) braziliensis*. A transfecção dos parasitos não alterou suas características biológicas avaliadas pelo crescimento de promastigotas em cultura, a infectividade para células THP-1 e para camundongos Balb/c em nenhuma das cepas transfectadas. A atividade da enzima medida através de ensaio colorimétrico mostrou correlação direta entre a leitura e o número de parasitos. A expressão da enzima foi estável nas linhagens selecionadas, mesmo na ausência da pressão do antibiótico de seleção, indicando a integração do gene que foi confirmado através de PCR. Ensaios de atividade enzimática utilizando promastigotas mostraram um limite inferior de detecção de 780 parasitos por cavidade, permitindo a determinação da atividade enzimática em amastigotas intracelulares. A transfecção em *L. (V.) braziliensis* não alterou a susceptibilidade aos fármacos leishmanicidas de uso clínico: anfotericina B e miltefosina. Contudo, o processo de transfecção provocou a resistência dos parasitos aos fármacos paromomicina e glucantime, 3 a 10 vezes acima da IC_{50} da

cepa parental. Os resultados obtidos pela metodologia colorimétrica foram semelhantes aos obtidos pela metodologia clássica de contagem através de microscopia, padronizando assim o ensaio.

Palavras chave: Leishmaniose, *Leishmania (V.) braziliensis*, β -galactosidase, Ensaio colorimétrico.

ABSTRACT

Leishmaniasis affects about 12 million people worldwide and represents a global health problem. It is necessary the development of less laborious, faster and more sensitive and compatible with automation methods for the study of new active compounds against the disease. In this present study, we transfected in a integrative form the β -galactosidase in three species of *Leishmania* (*L. (L.) infantum*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*) aiming the standardization of a reproducible, fast and sensitive colorimetric assay for screening of compounds active against intracellular amastigotes using the transfected strain of *L. (V.) braziliensis*. Transfection did not alter the parasite's biological characteristics evaluated by promastigote growth in culture, infectivity on THP-1 cells and on Balb/c mice for any of the transfected strain. The enzymatic activity measured by colorimetric assay showed direct correlation between the reading and the number of parasites. Enzymatic expression was stable under the selected strains even in the absence of the selection antibiotic pressure, indicating the integration of the gene, which was confirmed by PCR. Enzymatic activity assay using promastigotes showed a lower limit of 780 parasites per well, allowing the determination of the enzymatic activity in intracelular amastigotes. Transfection in *L. (V.) braziliensis* did not alter the susceptibility to the drugs: amphotericin B and miltefosine. However the tranfection process led to resistance to the drugs paromomycin and glucantime, 3 to 10 times higher from the IC₅₀ of the wild type parasite. Results obtained

by the colorimetric assay were similar to the ones obtained by the classical methodology of microscopic counting, validating the assay.

Key words: Leishmaniasis, *Leishmania (V.) braziliensis*, β -galactosidase, Colorimetric assay.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 – Ciclo biológico de *Leishmania* sp.**
- Figura 2 – Manifestações clínicas da leishmaniose**
- Figura 3 – Antimoniais Pentavalentes**
- Figura 4 – Drogas leishmanicidas utilizadas na clínica**
- Figura 5 – Clivagem do CPRG pela enzima β -galactosidase**
- Figura 6 – Mapa do plasmídeo pLEXSY-LacZ**
- Figura 7 - Digestão completa do plasmídeo pLEXSY-LacZ**
- Figura 8 – Expressão de β -galactosidase em promastigotas das cepas parentais de *Leishmania* sp.**
- Figura 9 – Absorbância dos clones de *Leishmania* sp.**
- Figura 10 – Gráficos de expressão da β -galactosidase dos clones das diferentes espécies de *Leishmania***
- Figura 11 – Confirmação da integração do plasmídeo pLEXSY-LacZ no genoma de *Leishmania* sp.**
- Figura 12 – Curvas de Crescimento de *Leishmania* sp.**
- Figura 13 – Lesão em pata de camundongo e esfregaço de pata de camundongo corado pelo método de Giemsa**
- Figura 14 – Expressão da β -galactosidase de parasitos cultivados na ausência e presença de antibiótico G418**

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Composição dos tampões BSF 1x e BSF 3x.

Tabela 2 – Limites inferiores de detecção do número de parasitos antes e após clonagem expressando β -galactosidase

Tabela 3 – Taxa de infecção *in vitro* de *L. (V.) braziliensis* M2904 em células THP-1 diferenciadas

Tabela 4 – Susceptibilidade da cepa parental de *L. (V.) braziliensis* M2904 e de seus clones expressando a enzima β -galactosidase a fármacos leishmanicida padrão

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 – Principais genes repórter utilizados para transfecção em *Leishmania* sp., suas vantagens e desvantagens

LISTA DE EQUAÇÕES

Equação 1 – Cálculo do índice parasitário, conforme descrito por Sereno e colaboradores (2001)

$$IP = (1 - \text{Amastigotas/célula} \times \% \text{ de células infectadas}) \times 100$$

Equação 2 – Cálculo do índice parasitário após leitura das absorbâncias.

$$IP = [1 - (\text{Abs poço infectado} - \text{Abs poço sem infecção})] \times 100$$

LISTA DE ABREVIATURAS

ANOVA	Análise de variância
BSF	Buffer Scale Factor
CAT	Clorafenicol acetil transferase
CC ₅₀	Concentração que inibe 50% do crescimento celular
CI ₅₀	Concentração que inibe 50% dos parasitos
CPRG	Clorofenol vermelho-β-D-galactopiranosídeo
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DO	Densidade óptica
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
G418	Geneticin
GFP	Proteína verde fluorescente
HEPES	Ácido 2-[4-(2-hidroxietil)1-piperazinil]-etanosulfônico
IFI	Imunofluorescência Indireta
IP	Índice parasitário
IS	Índice de seletividade
LacZ	Gene da β-galactosidase
LC	Leishmaniose cutânea
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LMC	Leishmaniose muco-cutânea
LV	Leishmaniose visceral

MTT	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio
NP-40	Nonidet P-40
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	Tampão Salino Fosfato
PCR	Reação em cadeia da Polimerase
PMA	Forbol-12-miristato-13-acetato
RPMI	Meio de cultura Roswell Park Memorial Institute 1650
SBF	Soro bovino fetal
SSU	Subunidade pequena do DNA ribossomal
THP-1	Linhagem de células humanas de leucemia monocítica aguda
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
v/v	Volume/volume
β -gal	Beta Galactosidase

LISTA DE SÍMBOLOS

μg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar
CO_2	Dióxido de Carbono
Da	Dalton
g	Grama
kpb	Quilopares de base
L	Litro
M	Molar
mg	Miligrama
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mM	Milimolar
mmol	Milimol
ng	Nanograma
nm	Nanômetro
$^{\circ}\text{C}$	Graus Celcius
pH	Potencial hidrogeniônico
pmol	Picomol

SUMÁRIO

INTRODUÇÃO	29
1 REVISÃO DA LITERATURA	32
1.1 Leishmanioses	32
1.1.1 Histórico	32
1.1.2 Biologia do parasito	33
1.1.3 Patogenia e manifestações clínicas	36
1.1.4 Diagnóstico	38
1.1.4 Epidemiologia	40
1.1.5 Tratamento	41
1.2 Novos fármacos	45
1.2.1 Gene repórter	47
2 OBJETIVOS	54
2.1 Objetivo geral	54
2.2 Objetivos específicos	54
3 MATERIAIS E MÉTODOS	55
3.1 Construção do vetor	55
3.2 Cultivo dos parasitos e das células	57
3.3 Transfecção, seleção e clonagem de parasitos	57
3.4 Expressão da β -galactosidase	60
3.5 PCR para confirmação de integração do plasmídeo	61
3.6 Caracterização biológica da cepa transfectada	62
3.7 Padronização da infecção <i>in vitro</i>	63
3.8 Susceptibilidade aos fármacos	65
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	67
4.1 Construção do vetor e transfecção de parasitos	67
4.2 Clonagem das cepas de <i>Leishmania</i> expressando β -galactosidase	69
4.3 Análise da manutenção dos parâmetros biológicos das cepas	77
4.7 Susceptibilidade a fármacos	85

5 Conclusões	92
6 Referências Bibliográficas	93
APÊNDICE 1 – Artigo publicado na Revista Brasileira de Farmacognosia	105
APÊNDICE 2 – Resumo do XI Congresso Latinoamericano de Botânica	109
APÊNDICE 3 – Resumo publicado nos Anais do XXIII Seminário de Iniciação Científica da UFMT	110
APÊNDICE 4 – Resumo publicado na Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada	111

INTRODUÇÃO

As leishmanioses constituem um grupo de doenças clinicamente diversas causadas por protozoários parasitos do gênero *Leishmania*, que são transmitidos entre hospedeiros mamíferos através da picada de insetos fêmeas de flebotomíneos. Estima-se em 12 milhões o número de pessoas infectadas e em 350 milhões o número de indivíduos que vivem em áreas com risco de contágio (OMS, 2010). Em 2012, foram estimados 300 mil casos de leishmaniose visceral (LV) com mais de 20 mil mortes/ano e 1 milhão de casos de leishmaniose tegumentar (LT), além de cerca de 350 milhões de pessoas vivendo em áreas de risco de transmissão nos seis países que possuem mais de 90% dos casos de LV (OMS, 2012). Fatores como migração e mobilidade crescente de indivíduos de áreas afetadas, mudanças climáticas globais e a falta de uma vacina efetiva contribuem para a expansão e urbanização da doença (OMS, 2010; SERENO et al., 2007).

O tratamento das leishmanioses é realizado com fármacos antimoniais pentavalentes, antimoniato de meglumina (Glucantime®) e Estibogluconato de sódio (Pentostam®) há mais de 60 anos no mercado, sendo que esse último não é comercializado no Brasil (CROFT; YARDLEY, 2002; KAYSEL-CRUZ et al, 2009). Este tratamento possui eficácia limitada e causa efeitos adversos variados, além de já ter sido relatada a resistência de algumas espécies de *Leishmania* a estes fármacos em algumas regiões do mundo (ALVAR; CROFT; OLLIARO, 2006). A anfotericina B, antifúngico poliênico, é o fármaco de segunda escolha, indicado principalmente no tratamento de lesões mucosas e de recidivas, porém possui elevada toxicidade e, por isso, seu uso é

limitado (GONTIJO; CARVALHO, 2003; CORRALES et al., 2010).

Devido ao limitado arsenal terapêutico atual, à complexidade epidemiológica da doença e ausência de uma vacina eficaz, a busca de novas moléculas ativas contra esta parasitose é imperativa. Os esforços para este fim baseiam-se majoritariamente na seleção de compostos de origem natural ou sintética, capazes de inibir o crescimento/multiplicação do patógeno *in vitro*, muitas vezes utilizando-se formas promastigotas do parasito. A validade desses resultados é limitada em virtude da baixa correlação dos resultados obtidos em promastigotas, em relação aos amastigotas intracelulares no contexto da doença humana (SERENO et al., 2007, GUPTA; NISHI, 2011). Diferenças bioquímicas entre as formas, bem como a ausência do ambiente intracelular natural encontrado *in vivo* pelo parasito, são entraves importantes desta abordagem (MONTE-ALEGRE; OUAISSI; SERENO, 2006). Ensaios com amastigotas intracelulares são desejáveis, uma vez que mimetizam a condição intracelular do parasito no hospedeiro humano (KAYSEL-CRUZ, 2009). Apesar disso, os métodos clássicos de quantificação dos parasitos intracelulares são laboriosos e sujeitos à inacurácia. Um exemplo disso é a técnica de contagem microscópica, após coloração das células infectadas pelo método de Giemsa, desenvolvida por Berman e Lee (1984), e é utilizado até hoje. Tais limitações claramente impedem seu emprego para a avaliação de um grande número de compostos (FUMAROLA; SPINELLI; BRANDONISIO, 2004; GUPTA; NISHI, 2011; REIMÃO et al, 2015).

Desta forma, uma metodologia que possa ser semi-automatizada ou automatizada e que viabilize a avaliação de compostos focando no estágio de amastigota intracelular de um modo simples, rápido,

reprodutível e economicamente viável terá uma grande contribuição no campo da triagem e estudo de compostos leishmanicidas.

Um teste colorimétrico utilizando a cepa de *L. (L.) amazonensis* transfectada com o gene da β -galactosidase foi recentemente desenvolvido no Laboratório de Protozoologia da Universidade Federal de Santa Catarina (TONINI, 2013). Esta espécie e cepa foram preconizadas pela *Research Initiative on Natural Products Against Neglected Diseases* (ResNetNPD) como modelo para a triagem de compostos leishmanicidas devido à sua facilidade de cultivo *in vitro*. Entretanto, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* são as espécies de maior importância epidemiológica, não apenas por responderem por mais de 80% dos casos de leishmaniose cutânea, mas também por serem os agentes etiológicos da forma mucocutânea da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013; GOTO; LINDOSO, 2010; OMS, 2010).

Considerando que *L. (V.) braziliensis* é a espécie prevalente no país, e que a resposta ao mesmo fármaco é distinta entre as diferentes espécies, a implementação de um ensaio de atividade leishmanicida utilizando *L. (V.) braziliensis* transfectada com o gene da β -galactosidase é de grande relevância na busca de novos fármacos antiparasitários.

1 REVISÃO DA LITERATURA

1.1 Leishmanioses

1.1.1 Histórico

As leishmanioses são clinicamente diversas de doenças causadas por aproximadamente vinte espécies de protozoários parasitos do gênero *Leishmania*. (Kinetoplastida: Trypanosomatidae) cuja transmissão entre hospedeiros mamíferos se dá através da picada de insetos fêmea de flebotomíneos (Diptera: Pschycodidae). As leishmanioses são zoonoses que afetam mamíferos silvestres e domésticos e acometem o homem de forma acidental, sendo este último muitas vezes considerado o disseminador da doença (ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003, KEVRIC; CAPPEL; KELLING, 2015; GONZALEZ et al, 2015).

Conhecida no velho mundo como “botão-do-orientes”, existem relatos de lesões compatíveis com as de leishmaniose cutânea em tábuas da biblioteca do rei Ashurbanipal, datado do século VII a.C.. Existem descrições detalhadas do botão-do-orientes feitas por um médico árabe e datadas do século X d.C.. (COX, 2002). A leishmaniose visceral, caracterizada por emagrecimento progressivo, febre, anemia e esplenomegalia, é facilmente confundida com outras doenças, especialmente a malária. Até a descoberta do parasito, *Leishmania donovani*, por William Leishman e Charles Donovan, independentemente, em 1900, os médicos estavam convencidos que o calazar era uma forma virulenta da malária (COX, 2002).

Peças de cerâmica originárias do Peru e Equador (huacos),

datadas da época pré-colombiana e encontradas em 1985 por Virchow, retratando rostos humanos com deformações graves bastantes similares às causadas pela leishmaniose mucocutânea sugerem que a leishmaniose nas Américas é uma doença antiga. Originalmente, foi pensado que as espécies causadoras de leishmaniose no novo mundo fossem as mesmas do velho mundo, mas, em 1911, Gaspar Vianna descobriu que os parasitos da América do Sul eram diferentes daqueles encontrados na África e na Índia, e descreveu uma nova espécie, *Leishmania braziliensis* (VIANNA, 1911). Desde então, um grande número de outras espécies únicas no Novo Mundo foi descrito.

1.1.2 Biologia do parasito

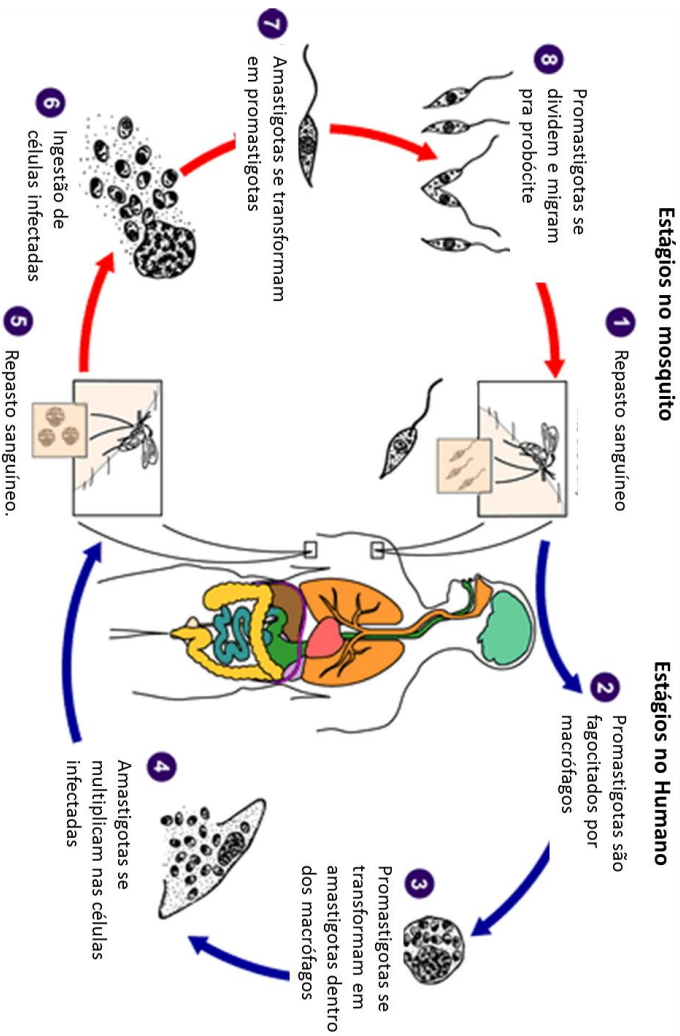
Pelo menos vinte espécies são patogênicas para humanos e trinta espécies de flebotomíneos são vetores confirmados (DESJEUX, 2004; BOELAERT; SUNDAR, 2013). Na Amazônia brasileira, que tem a maior variedade de espécies do parasito no mundo e o maior número de casos de infecção do país, a doença é causada, principalmente, por seis espécies do subgênero *Viannia* (*L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) shawi*, *L. (V.) lisoni*, *L. (V.) naiffi* e *L. (V.) linderberg*) e uma espécie do subgênero *Leishmania* (*L. (L.) amazonensis*) (SILVEIRA et al., 2009; BRITO et al., 2012).

Os hospedeiros vertebrados são infectados quando formas promastigotas metacíclicas são regurgitadas pelas fêmeas de flebotomíneos durante o repasto sanguíneo. As formas promastigotas metacíclicas, que são resistentes à lise pelo complemento, se aderem à membrana dos macrófagos e são fagocitadas por estes. Dentro do

macrófago, as formas promastigotas se transformam em amastigotas, que se multiplicam sucessivamente dentro do vacúolo digestivo, ocasionando o rompimento da célula e liberando os amastigotas para o meio extra-celular, onde eles serão fagocitados por outros macrófagos (CUNNINGHAM, 2002).

Quando a fêmea do flebotomíneo se alimenta de um animal infectado, ela ingere os amastigotas e macrófagos infectados presentes no sangue. No trato digestivo do inseto, as formas amastigotas se transformam em promastigotas flagelados móveis que se proliferam através de divisão binária. Após aproximadamente uma semana do repasto sanguíneo ocorre o processo de metaciclogênese, com o surgimento de parasitos não proliferativos: os promastigotas metacíclicos (CUNNINGHAM, 2002; WILLIAMS et al., 2006; MURRAY; BERMAN; SARAVIA, 2005; SHARMA; SINGH, 2010).

O ciclo de vida do parasito está esquematizado na figura 1.

Figura 1 – Ciclo biológico de *Leishmania* sp.

Fonte: Modificado de CDC. <http://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>. Acesso em: 21/07/2015, 11:04

1.1.3 Patogenia e manifestações clínicas

As leishmanioses podem ser divididas em dois grandes grupos: as Leishmanioses Dermotrópicas/Mucotrópicas (tegumentares) e as Leishmanioses Viscerotrópicas. O primeiro grupo denomina-se assim porque afeta principalmente a pele e mucosas das vias aéreas superiores, sendo clinicamente reconhecidas três apresentações: a leishmaniose cutânea (LC), a leishmaniose muco-cutânea (LMC) e a leishmaniose cutânea difusa (LCD). As formas viscerotrópicas afetam órgãos internos como baço, fígado, linfonodos e medula óssea, sendo comumente denominada de “calazar” ou “febre de dum-dum” (ALTAMIRANO-ENCISO et al., 2003). O principal determinante da forma da doença é o parasito, embora as condições imunológicas do hospedeiro e características do vetor também tenham sua importância (MURRAY; BERMAN; SARAVIA, 2005; KEDZIERSKI; EVANS, 2014).

A classificação das leishmanioses é feita de acordo com a apresentação clínica da doença, sendo que o principal fundamento para essa classificação é o tropismo de determinadas espécies de *Leishmania* para locais do corpo do hospedeiro (MURRAY et al., 2005). A forma tegumentar da doença é a mais prevalente, sendo que suas subclassificações clínicas (LC, LMC e LCD) são classificadas de acordo com a extensão e persistência das lesões observadas na derme.

A forma cutânea da doença (LC) (figura 2A) é a forma mais prevalente da doença. Após período de incubação, aparece uma pequena pápula indolor bem delimitada, de bordas elevadas e fundo granuloso, acompanhada de prurido e linfonodomegalia local. Esta lesão pode se curar espontaneamente ou desenvolver-se para as outras formas da

doença (REITHINGER et al., 2007, MURRAY et al, 2005, SOONG; HENARD; MELBY, 2012).

A leishmaniose muco-cutânea (LMC) (figura 2B) é uma variação da LC onde acontece a destruição progressiva de mucosas, mais comumente nas mucosas de nariz, faringe, boca e laringe, com comprometimento, muitas vezes, desfigurante das cartilagens (GOTO; LINDOSO, 2010). Das espécies relacionadas com as leishmanioses muco-cutâneas, a *Leishmania V. braziliensis* é a mais prevalente no homem (GONTIJO; CARVALHO, 2003; GOTO; LINDOSO, 2010, OMS, 2010).

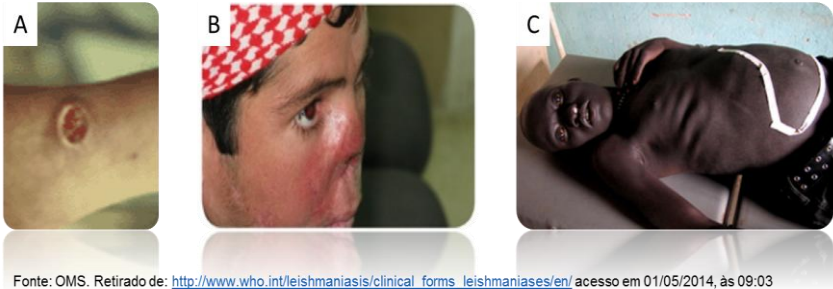
A leishmaniose cutânea difusa (LCD) produz nódulos não ulcerados, disseminados por todo o corpo e a disseminação, supostamente, ocorre devido a anergia imunológica de alguns indivíduos aos antígenos do parasito (AMEEN, 2010; GOTO; LINDOSO, 2010). Essa forma da doença pode ser causada por várias espécies, como *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) mexicana* e *L. (L.) venezuelensis* (CROFT; YARDLEY, 2002).

Apesar de não ser considerada fatal, a forma tegumentar das leishmanioses ocasiona elevadas taxas de morbidade, podendo causar lesões desfigurantes nos indivíduos acometidos, comprometendo, assim, sua qualidade de vida.

A forma visceral (LV) (figura 2C) é a forma mais grave da doença, caracterizada pelo comprometimento do fígado, baço e medula óssea. Os sintomas incluem febre, perda de peso e hepatoesplenomegalia. Em alguns casos, o indivíduo pode permanecer assintomático por um longo período de tempo, chegando a ficar assintomático por décadas. O óbito ocorre devido a co-infecções

decorrentes do comprometimento do sistema imunológico, além do sangramento massivo ou anemia severa (CLEM, 2010). No Brasil, essa forma da doença é causada exclusivamente pela *L. (L.) infantum*.

Figura 2 – Manifestações clínicas da leishmaniose – (A) Forma cutânea clássica; (B) Muco-cutânea com perda da mucosa nasal; (C) Visceral.



Fonte: OMS. Retirado de: http://www.who.int/leishmaniasis/clinical_forms_leishmaniasis/en/ acesso em 01/05/2014, às 09:03

1.1.4 Diagnóstico

O Ministério da Saúde, no Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013), preconiza que o diagnóstico deve se basear na evidenciação do parasito e em provas imunológicas. A evidenciação do parasito é feita através de exames diretos e indiretos, cujo material pode ser retirado da pele, mucosa ou gânglios acometidos. Para a pesquisa direta do parasito devem ser utilizados os procedimentos de escarificação, biópsia com impressão por aposição e punção aspirativa. Esses materiais podem ser corados para microscopia ou inoculados em hamsters. O diagnóstico imunológico pode ser feito através da intradermoreação de

Montenegro, imunofluorescência indireta (IFI) e teste imunoenzimático (ELISA), sendo que esses últimos devem ser realizados em centros de referência (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Também podem ser feitos testes moleculares como a PCR e a caracterização das espécies em isolados de cultura ou *in situ*, por meio de diferentes técnicas como a PCR, anticorpos monoclonais e eletroforese de isoenzimas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013).

O diagnóstico laboratorial da leishmaniose cutânea baseia-se principalmente na pesquisa de parasitos no esfregaço das lesões. Pode-se também realizar a intradermorreação de Montenegro, que é uma reação de hipersensibilidade tardia. Esse teste consiste em injetar por via intra-dérmica um antígeno padronizado de *Leishmania* na face anterior do braço. Após 48 - 72 horas a reação é considerada positiva se a endureção for maior que 5mm.

A ulceração típica da leishmaniose tegumentar recebe o nome de “úlceras com bordas em moldura” e é caracterizada como uma úlcera com bordas elevadas, infiltradas e de coloração eritematoviolácea. O fundo da úlcera é constituído por granulações vermelhas e, frequentemente, recoberto por secreções serosas ou seropurulentas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013). Entretanto, a leishmaniose tegumentar americana também produz um amplo espectro de lesões, podendo simular outras doenças como piodermites ou micoses superficiais. Esse espectro torna, muitas vezes, o diagnóstico clínico bastante difícil (GONTIJO; CARVALHO, 2003; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013)

O diagnóstico clínico de leishmaniose visceral deve ser suspeitado quando o paciente apresentar febre e esplenomegalia

associado ou não à hepatomegalia. Na fase inicial da doença, a sintomatologia varia de paciente para paciente, sendo que na maior parte dos quadros, inclui febre com duração inferior a quatro semanas, palidez cutâneo mucosa e hepatoesplenomegalia. Em áreas endêmicas, uma pequena proporção de indivíduos pode apresentar um quadro clínico discreto, de curta duração, que frequentemente evolui para uma forma oligossintomática (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O diagnóstico laboratorial mais utilizado no Brasil para a forma visceral da leishmaniose são os testes sorológicos (ELISA e IFI) e o diagnóstico conclusivo se dá pela demonstração do parasito por métodos parasitológicos e/ou PCR a partir de punção aspirativa da medula óssea. (MINISTERIO DA SAUDE, 2006).

A intradermoreação de Montenegro, ao contrário do que ocorre na leishmaniose tegumentar, é negativa durante todo o curso da doença, podendo positivar após a cura clínica do paciente.

1.1.4 Epidemiologia

A doença está amplamente distribuída no mundo, ocorrendo de forma endêmica em 98 países tropicais e subtropicais e sua notificação é compulsória em apenas 30 deles. Estima-se que aproximadamente 350 milhões de pessoas residem em áreas com risco de infecção e que a leishmaniose visceral cause mais de 50 mil óbitos anuais (OMS, 2010; OMS, 2013).

A OMS (2010) estima que a incidência anual é de aproximadamente 2 milhões de novos casos (aproximadamente 500 mil casos de leishmaniose visceral e 1,5 milhão de casos da forma

tegumentar). Mais de 90% dos casos de LV ocorrem em seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão e Nepal (OMS, 2010, 2013). Para a LC, mais de 90% dos casos ocorrem no Afeganistão, Algéria, Irã, Arábia Saudita, Síria, Bolívia, Brasil, Colômbia, Nicarágua e Peru. A frequência de LCD e LMC é maior na América do Sul. Focos relativamente menores tanto de LC quanto de LV estão na região mediterrânea da Europa (OMS, 2010, 2013).

No Brasil, durante muito tempo a LV foi considerada uma doença rural, entretanto, vem emergindo com proporções epidêmicas em áreas urbanas do país devido a ondas migratórias rural-urbanas e às condições sociais precárias, associadas a alta soro-prevalência da doença em caninos e a adaptabilidade do vetor *Lutzomya longipalpis* a estas condições (LAINSON; RANGEL, 2005; WERNECK et al., 2007; HARHAY et al., 2011). A LV, no Brasil, é causada apenas pelo parasito da espécie *L. (L.) infantum*. Já a LC possui diversos agentes etiológicos, sendo os principais *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) guyanensis* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Segundo as bases de dados do DATASUS 3.470 casos de leishmaniose visceral humana foram confirmados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan) no ano de 2013 em todo o território nacional. No mesmo período de 2013, foram confirmados 18.675 casos de leishmaniose tegumentar em todo o território nacional.

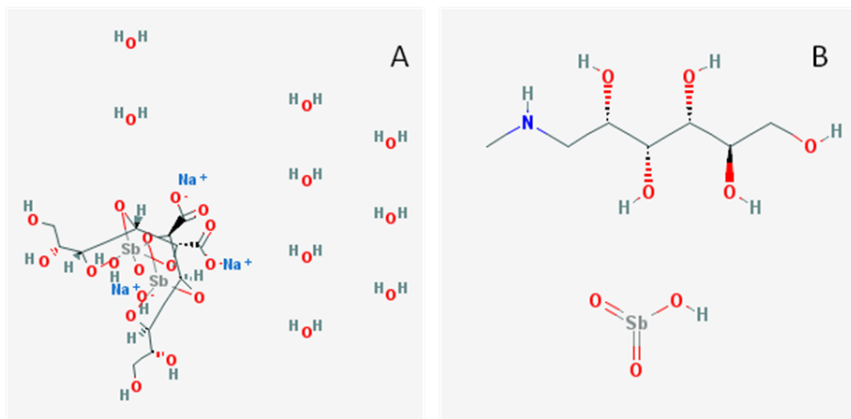
1.1.5 Tratamento

Atualmente, a quimioterapia para o tratamento das leishmanioses inclui fármacos antimoniais pentavalentes, anfotericina B, pentamidina,

miltefosina, paromomicina e fármacos antifúngicos do grupo dos azóis (CROFT; COOMBS, 2003; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010).

Os fármacos de primeira escolha são os antimoniais pentavalentes, antimoniato de meglumina (Glucantime®) e estiboglucanato de sódio (Pentostam®) (figura 3), sendo que esse último não é comercializado no Brasil. Esses fármacos foram introduzidos na clínica em 1945 e são efetivos no tratamento de diversas formas de leishmaniose (CROFT; COOMBS, 2003), apesar de terem sido relatadas diferenças intrínsecas na sensibilidade a esses fármacos de acordo com a espécie do parasito (CROFT; SUDAR; FAIRLAMB, 2006). Nos últimos 15 anos, têm sido relatados diversos casos de LV resistente aos antimoniais na Índia (SUNDAR, 2001; SUNDAR et al., 2000; OBONAGA et al., 2014).

Figura 3 – Fármacos Antimoniais Pentavalentes – (A) Estiboglucanato de Sódio; (B) Antimoniato de Meglumina



No Brasil, o Ministério da Saúde (2013) recomenda doses que variam de 10 a 20 mg Sb⁵⁺/kg/dia, sugerindo uma dose de 15 mg Sb⁵⁺/kg/dia, tanto para crianças como para adultos, por 20 dias seguidos. Após o tratamento, se não houver cicatrização da ferida nas leishmanioses tegumentares, em até 12 semanas, recomenda-se que o paciente seja reavaliado e, caso haja necessidade, o esquema terapêutico deve ser repetido, dessa vez com duração de 30 dias. Em caso de novamente ocorrer falha, recomenda-se utilizar um dos fármacos de segunda escolha.

A anfotericina B (figura 4A) é um antifúngico poliênico derivado de *Streptomyces nodosus*, que é utilizado para o tratamento de leishmanioses desde a década de 1960, como fármaco de segunda escolha. Esse fármaco apresenta uma ótima atividade leishmanicida, porém seu custo elevado impede a utilização em larga escala. Ele também apresenta vários efeitos adversos, tais como febre, anorexia, náuseas, vômitos e flebite, e alguns efeitos mais graves, como hipopotassemia, insuficiência renal, anemia, leucopenia e alterações cardíacas (SUNDAR et al, 2010; CROFT; OLLIARO, 2011). O Ministério da Saúde (2013) orienta que o tratamento com esse fármaco deve ser iniciado com doses de 0,5mg/kg/dia, aumentando gradualmente até 1mg/kg/dia em dias alternados. Orienta ainda que durante o tratamento deve ser feita uma vigilância clínica rigorosa e provas laboratoriais que permitam avaliar, principalmente, a função renal do paciente. Sua administração é por infusão endovenosa lenta (4 horas de infusão) e é contra-indicada em gestantes, cardiopatas, nefropatas e hepatopatas.

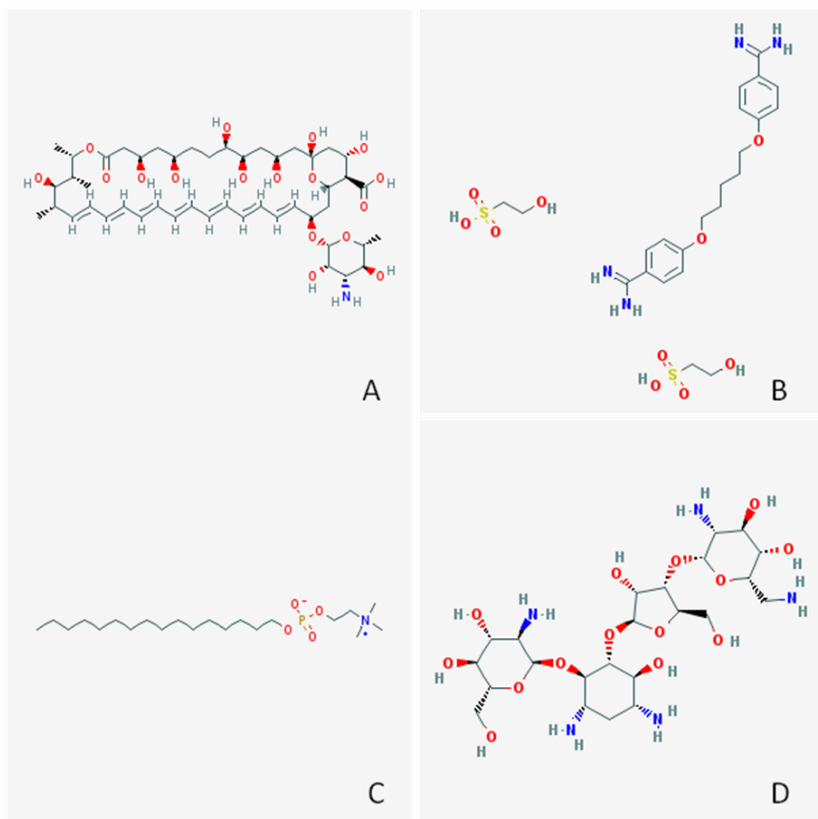
A pentamidina (figura 4B) é uma diamina, relativamente eficaz no tratamento de casos incipientes de leishmaniose. Classicamente, recomenda-se uma dose de 4mg/kg/dia por via intramuscular profunda, de 2 em 2 dias (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000). O medicamento pode provocar a hipoglicemia, seguido de hiperglicemia. Na região Amazônica do Brasil e em outros países da América do Sul, a pentamidina foi administrada em portadores da forma cutânea da leishmaniose a pentamidina, na dose de 720 mg, com excelentes níveis de cura clínica e efeitos colaterais mínimos (COSTA, 1993, SANDS; KRON; BROWN, 1985). Estudos realizados em Brasília com pacientes portadores de lesões cutâneas causadas por *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) amazonensis*, usando as mesmas doses durante 12 meses (SAMPAIO et al., 1988), mostraram resultados semelhantes aos obtidos por pacientes que foram tratados com um fármaco antimônio pentavalente.

A miltefosina (figura 4C) é uma hexadecilfosfocolina originalmente desenvolvida para o tratamento de câncer. Atualmente, é o primeiro e único fármaco administrado por via oral para o tratamento das leishmanioses. Esse fármaco, que não está disponível no Brasil, é administrado na dose de 2,5 mg/kg/dia durante 28 dias (SUNDAR et al., 2012).

A paromomicina (figura 4D) é um antibiótico de amplo espectro obtido da bactéria *Streptomyces rimosus* e foi introduzido para o tratamento de leishmaniose em 2006 (SUNDAR et al., 2007). Em geral, é administrada uma dose de 15 mg/kg/dia durante 21 dias por via intramuscular. É um fármaco de baixo custo, com menos efeitos colaterais e menor tempo de administração, sendo por isso um bom candidato para ser utilizado na terapia de primeira escolha de pacientes

com leishmaniose visceral (OLLIARO et al., 2005; SUNDAR et al., 2009).

Figura 4 – Fármacos leishmanicidas utilizados na clínica – (A) Anfotericina B; (B) Pentamidina; (C) Miltefosina; (D) Paromomicina



Fonte: Pubchem. Números de acesso: 5280965, 8813, 3599, 165580. Acesso em: 02/10/2015 às 10:42

1.2 Novos fármacos

Devido à falta de vacinas eficientes, ao uso de fármacos altamente tóxicos que exigem administração parenteral, à constantes

relatos de falhas terapêuticas, ao aumento dos casos de leishmaniose por causa de co-infecções com HIV, ao aumento de viagens e conflitos internacionais, faz-se necessário a busca de novos fármacos leishmanicidas (GUPTA; NISHI, 2011, KAYSEL-CRUZ et al., 2009).

Na busca de novos fármacos pode-se utilizar três estratégias: utilização de vias metabólicas já validadas para outros parasitos, como a via da biossíntese do ergosterol ou a via da tripanotona reductase, testes de novos compostos e testes com fármacos já utilizados no tratamento de outras patologias (SERENO et al., 2007)

Neste sentido, testes *in vitro* de novos compostos são desejados, pois são mais rápidos e apresentam resultados mais consistentes que os testes *in vivo*, além de usarem menos parasitos por teste (CROFT, 1986); porém é importante salientar que os resultados dos testes *in vitro* precisam sempre ser posteriormente confirmados em animais.

Testes utilizando promastigotas são mais simples e baratos, entretanto, o metabolismo dessa forma de parasito é bastante diferente da forma amastigota (forma alvo) e os testes com promastigotas mostraram pouco valor em animais (PETERS; EVANS; LANHAM, 1983; CROFT; SEILFERT; YARDLEY, 2006). Por causa disso, eles foram praticamente abandonados (GUPTA; NISHI, 2011).

Testes com amastigotas são mais eficientes, mas são mais trabalhosos. Pode-se usar amastigotas axênicos ou intracelulares, mas em ambos os casos, precisa-se criar condições que mimetizam o meio ambiente que o parasito encontra na célula-alvo (GUPTA; NISHI, 2011).

As vantagens de se utilizar amastigotas axênicos é que o teste é feito com a forma relevante do parasito, eles são fáceis de obter, e a

quantificação da atividade é simples e barata, sendo comumente utilizadas metodologias já padronizadas como o ensaio colorimétrico do MTT, o ensaio que mede a atividade da ornitina descarboxilase e o ensaio com o corante vital alamar blue (SERENO et al., 2005; 2007, SHIMONYA; JAFFE, 2008; CALLAHAM et al., 1997). A maior desvantagem desse ensaio é que não é realizado nenhum teste para a penetração do composto na célula hospedeira ou para o ambiente peculiar do fagolisossomo.

Metodologias que empregam amastigotas intracelulares são as com mais relevância. Esta forma do parasito é a que mais se aproxima da condição intracelular do parasito no hospedeiro mamífero (KAYSEL-CRUZ et al., 2009). As linhagens celulares mais amplamente utilizadas nesse caso são THP-1, U937 e HL-60 (ESCOBAR et al., 2002; YARDLEY et al., 2005). Essas linhagens são monócitos, que podem se diferenciar em macrófagos, que não se dividem, facilitando a obtenção da taxa de infecção e atividade do composto em teste (GUPTA; NISHI, 2011; ESCOBAR et al., 2002). Os resultados são obtidos através de contagem do número de células infectadas e do número de amastigotas por célula com o auxílio do microscópio óptico (NEAL; CROFT, 1984, BERMAN; LEE, 1984). Essa metodologia clássica é laboriosa, pouco eficaz e não é compatível com automação (FUMAROLA; SPINELLI; BRANDONISIO, 2004).

1.2.1 Gene repórter

Com o avanço da tecnologia do DNA recombinante, tornou-se cada vez mais fácil a inserção de genes exógenos em um organismo.

Assim, metodologias envolvendo genes repórter são cada vez mais utilizadas para ajudar a elucidar a biologia de vários organismos.

O termo gene repórter é usado para definir um gene com um fenótipo prontamente mensurável que pode ser distinguido com facilidade de um *background* de proteínas endógenas (MONTE-ALEGRE; OUAISSI; SERENO, 2006; SERENO et al. 2007). A tecnologia dos genes repórter já foi eficientemente utilizada em bactérias (CHANGSEN; FRAZBLAU; PALITTAPONGAMPIM, 2003), vírus (DORSKY; NELLS; KARRINGTON, 1996) e parasitos (OKUNO et al., 2003). As vantagens são a geração de dados quantitativos e objetivos, aumento da produtividade e diminuição do trabalho manual (SERENO et al., 2007).

Dentre dos genes mais utilizados encontram-se os genes da proteína verde fluorescente (GFP), cloranfenicol acetil transferase (CAT), β -galactosidase, β -lactamase, luciferase e fosfatase alcalina (GUPTA; NISHI, 2011; SERENO et al., 2007; ROCHA et al, 2013; REIMÃO et al, 2015).

O quadro 1 mostra, resumidamente, os principais genes repórter utilizados par a transfecção em espécies de *Leishmania*, suas vantagens e desvantagens.

Quadro 1 – Principais genes repórter utilizados para transfecção em *Leishmania* sp., suas vantagens e desvantagens

Gene repórter	Vantagens	Desvantagens	Espécies já utilizadas
GFP	Simples; Cinética fácil de monitorar; Baixo custo; Elevada biossegurança.	A fluorescência do parasito diminui com o tempo sem a adição do antibiótico de seleção; Necessidade de equipamentos específicos para leitura de fluorescência.	<i>L. donovani</i> (epissomal) - Sing; Dube, 2009; <i>L. infantum</i> (epissomal) - Kamau; Grimm; Hehl, 2001; <i>L. amazonensis</i> (epissomal) - Chan et al, 2003

Continuação Quadro 1 – Principais genes repórter utilizados para transfecção em *Leishmania* sp., suas vantagens e desvantagens

<p>β-galactosidase</p>	<p>Pode ser quantificado por uma metodologia colorimétrica.</p>	<p>Proteína de alta massa molecular (aproximadamente 116 kDa o monômero); Baixa sensibilidade; Expressão endógena da enzima por algumas linhagens celulares de mamíferos.</p>	<p><i>L. amazonensis</i> (epissomal) - TONINI, 2013; <i>L. amazonensis</i> (epissomal) - OKUNO et al, 2003</p>
<p>β-lactamase</p>	<p>Pode ser quantificado por uma metodologia colorimétrica; Expressão da enzima altamente estável.</p>	<p>Baixa sensibilidade.</p>	<p><i>L. major</i> (epissomal) - BUCKNER; WILSON, 2005; <i>L. amazonensis</i> (epissomal) - BUCKNER; WILSON, 2005</p>

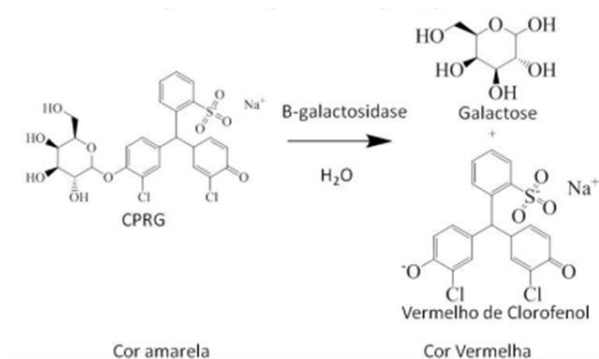
Continuação Quadro 1 – Principais genes repórter utilizados para transfecção em *Leishmania* sp., suas vantagens e desvantagens

Luciferase	Rápido; Bastante sensível; Não requer treinamento especializado; Reprodutível; Detecção apenas de parasitos e metabolicamente ativos; Ausência de <i>background</i> na célula hospedeira; Compatível com automação.	Substrato caro; Necessidade de aparelho para leitura de luminescência.	<i>L. donovani</i> (epissomal) – ASHUTOSH et al, 2005; <i>L. amazonensis</i> (integrativo) - LANG et al, 2005; <i>L. infantum</i> (epissomal) - SERENO et al, 2001; <i>L. major</i> (integrativo) - ROY et al, 2000; <i>L. donovani</i> (integrativo) - ROY et al, 2000
-------------------	---	---	---

Okuno e colaboradores (2003) mostraram que formas promastigotas de *L. amazonensis* expressando a enzima β -galactosidase tinham potencial para o uso em testes de triagem de compostos, pois a expressão poderia ser facilmente mensurada. Essa facilidade de mensuração deve-se à capacidade de detecção da enzima por um ensaio colorimétrico, acrescentando-se o substrato clorofenol vermelho- β -D-galactopiranosídeo (CPRG). Essa enzima quebra o CPRG (de cor amarela) em galactose e vermelho de fenol (cor vermelha) (figura 5) e a mudança de cor pode ser facilmente medida por espectrofotometria.

Apesar disso, foi questionada a eficácia de utilizar essa metodologia em amastigotas intracelulares, uma vez que macrófagos também expressam essa enzima (MONTE-ALEGRE; OUAISSI; SERENO, 2006). Tonini (2013) mostrou que esse problema pode ser facilmente contornado utilizando-se uma linhagem celular que produza baixas quantidades de β -galactosidase. Outra desvantagem no uso dessa enzima é seu tamanho (116 kDa), que poderia levar ao aumento do tempo de replicação do parasito e diminuição dos níveis de expressão ao longo do tempo (GUPTA; NISHI, 2011).

Figura 5 – Clivagem do CPRG pela enzima β -galactosidase – Esquema da clivagem do substrato CPRG pela enzima β -galactosidase levando a formação de galactose e vermelho de clorofenol.



Fonte: Tonini, 2013

Uma vez que as diferentes espécies de *Leishmania* não respondem igualmente aos fármacos leishmanicidas disponíveis, faz-se necessário utilizar sistemas de triagem de compostos que utilizem diferentes espécies do parasito. Considerando que a *L. (V.) braziliensis* é a principal responsável pela forma muco-cutânea da leishmaniose no Brasil, essa espécie foi escolhida nesse para a padronização, validação e posterior implementação no laboratório de Protozoologia (MIP, CCB, UFSC) de um ensaio colorimétrico para triagem de compostos com potencial ação leishmanicida.

Alem disso, também foram transfectadas cepas de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* para posteriores estudos utilizando essas espécies do parasito.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Implementar um ensaio colorimétrico para avaliar a potencial atividade leishmanicida de compostos contra formas amastigotas intracelulares de *L. (V.) braziliensis* expressando a enzima β -galactosidase

2.2 Objetivos específicos

- Transfectar cepas de *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum* com um plasmídeo integrativo contendo a enzima β -galactosidase de *Escherichia coli*;

- Selecionar clones e avaliar a estabilidade da transfecção e expressão da β -galactosidase;

- Avaliar o efeito da transfecção sobre o crescimento dos parasitos em cultura e sobre a infectividade *in vitro* e *in vivo* dos mesmos;

- Padronizar um ensaio colorimétrico para a triagem de compostos ativos contra amastigotas intracelulares de *L. (V.) braziliensis*.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Construção do vetor

O gene *LacZ* de *E. coli* foi amplificado por PCR a partir do plasmídeo pBS:CLNEO-01/BC-LacZ-10, construído por Buckner e colaboradores (1996). A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 10 µL contendo 10 pmol dos iniciadores senso (*LacZF* 5' AGATCTACCATGACCATGATTACGGATTC 3') e antisenso (*LacZR* 5' GGTACCTTATTTTTGACACCAGACCCAAC 3'), 0,2 mmol de dNTPs, Taq DNA polimerase e 30 ng/mL de DNA, nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C / 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 95°C / 30 segundos, 62°C / 30 segundos, 72°C / 3 minutos e um ciclo de extensão final a 72°C / 7 minutos. O produto amplificado foi purificado com o kit Illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK) conforme as instruções do fabricante.

O vetor de expressão integrativo pLEXSY-Neo2 e o produto de PCR purificado foram digeridos com as enzimas de restrição *KpnI* (Promega, Madison, USA) e *BglIII* (Jena Bioscience, Jena, Alemanha), conforme as instruções do fabricante. Os produtos de digestão do vetor foram monitorados através de eletroforese em gel de agarose 0,8% e a banda correspondente ao vetor digerido (aproximadamente 8kpb) e ao gene *LacZ* (aproximadamente 3,5kpb) foram cortadas e purificadas com o kit illustra GFX PCR DNA and Gel Band Purification (GE Healthcare, Buckinghamshire, UK).

Após purificação, o DNA plasmidial e o produto de PCR foram dosados por espectrometria e realizada a ligação com a T4 DNA ligase (Promega, Madison, USA) a 16°C, overnight.

Após ligação, foi procedida a transformação de bactérias *E. coli* DH5 α Ca²⁺ competentes por choque térmico, onde as bactérias previamente tratadas com cloreto de cálcio foram mantidas a 0°C em contato com o plasmídeo por 30 minutos, depois rapidamente aquecidas a 42°C por 45 segundos e então resfriadas novamente a 0°C por 2 minutos. A seguir, as bactérias foram plaqueadas em meio LB-ágar suplementado com 25 mg/mL de ampicilina (doravante chamado LB ampicilina) e incubadas a 37°C por 16 horas.

Com as colônias obtidas foi feito uma reação de PCR de colônia utilizando o iniciador senso do plasmídeo (A1432F 5' GCATGGCGATGCCTGCTTGC 3') e o iniciador antisense já utilizado para a clonagem do gene LacZ.

As colônias positivas para a reação de PCR foram cultivadas em meio LB ampicilina a 37°C por 16 horas sob agitação até atingir uma DO de 2 a 5. Cinquenta mL da cultura foi centrifugado, o sedimento lavado em PBS e submetido a extração plasmidial por midiprep, utilizando-se o kit Pure Yield Plasmid Midiprep System (Promega, Madison, USA).

O plasmídeo de cada colônia foi sequenciado em sequenciador 3500 Genetic Analyser (Applied Biosystems), para a confirmação da posição correta de inserção do gene. Cerca de 10 μ g do plasmídeo contendo o gene na posição correta foi linearizado com a enzima *Swa*I para a realização da transfecção integrativa dos parasitos.

3.2 Cultivo dos parasitos e das células

Promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis* das cepas MHOM/BR/75/M2904 e MHOM/BR/96/LSC96, chamadas nesse trabalho de M2904 e H3 respectivamente, *Leishmania (L.) infantum* da cepa MHOM/BR/74/PP75 e da cepa Pongo, chamadas aqui de PP75 e Pongo respectivamente, e *Leishmania (L.) amazonensis* cepa MHOM/BR/77/LTB0016, chamada nesse trabalho de LTB0016, foram cultivadas em garrafa de cultivo de 25 cm² a 26°C contendo 5 mL de meio Schneider's Insect Medium (Sigma Chemical Co. St Louis, MO, USA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) e 2% de urina humana, doravante chamado de meio Schneider, sendo realizados dois repiques semanais.

As células derivadas da linhagem monocitária humana THP-1 (ATCC® TIB 202™) foram cultivadas em garrafa de 75 cm² contendo meio RPMI 1640 sem vermelho de fenol (Sigma-Aldrich, CO. St. Louis, MO, USA) suplementado com 10% de SBF (Life Technologies, USA), 12,5 mM HEPES e 2 mM de Glutamax, doravante sendo chamado de meio RPMI completo, em garrafas de cultivo de células com filtro a 37°C, 5% de CO₂, sendo realizados dois repiques semanais. Para os experimentos, as células só foram utilizadas até o 15º subcultivo, quando então uma nova alíquota foi descongelada e cultivada.

3.3 Transfecção, seleção e clonagem de parasitos

Promastigotas em fase logarítmica de crescimento foram transfectados com o vetor construído como indicado no item 3.1 por

eletroporação utilizando o Basic Parasite Nucleofactor Starter kit (Amaxa/Lonza) com tampão de transfecção. Resumidamente, 5×10^8 parasitos foram lavados duas vezes com tampão PBS (pH 7,4) por centrifugação (2000g/10 min) e o sedimento celular suspenso em 70 μL de tampão BSF 1x. O DNA plasmidial foi preparado diluindo-se 10 μg do plasmídeo pLesxy-LacZ em um volume final de 20 μL de água ultrapura estéril acrescido de 10 μL do tampão BSF 3x, obtendo-se um volume final de 30 μL de solução. As composições dos tampões BSF 1x e BSF 3x estão descritas na tabela 1. O DNA plasmidial foi então misturado aos parasitos, obtendo-se um volume final de 100 μL e esse volume foi transferido para a cubeta de eletroporação do aparelho. Os promastigotas foram eletroporados no dispositivo Nucleofactor 2b® (Lonza) utilizando-se o programa U-033, e a seguir, foram transferidos para tubos tipo Falcon, contendo ágar sangue e meio Schneider e cultivados a 26°C. Após 24 horas de cultivo, iniciou-se a seleção dos parasitos transfectantes através da adição de concentrações crescentes do antibiótico Geneticin (G418), iniciando-se de 15 $\mu\text{g}/\text{mL}$.

Os promastigotas de *L. (V.) braziliensis* e *L. amazonensis* foram selecionados com G418 até uma concentração final de 150 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de antibiótico. Os promastigotas de *L. infantum* foram selecionados com o mesmo antibiótico até uma concentração final de 1mg/mL. Semanalmente, durante a seleção, foi realizado um teste de expressão da enzima β -galactosidase, após os parasitos iniciarem a expressão da enzima, foi realizada a clonagem dos parasitos através de diluição limitante em placas de 96 poços contendo 50 μL de ágar sangue em cada poço. Devido a dificuldade em clonar parasitos do gênero *Leishmania*, foram utilizados três protocolos diferentes de clonagem: em 16 poços da

placa foi dispensada uma solução contendo 1 parasito/poço, em 16 poços da placa foi dispensada uma solução contendo 0,5 parasito/poço e em 20 poços da placa foram realizadas diluições limitantes em razão de 1:2 até uma concentração final de 0,5 parasito/poço.

Tabela 1 – Composição dos tampões BSF 1x e BSF 3x.

Solução estoque	Concentração Tampão 1x	Tampão 1x	Concentração tampão 3x	Tampão 3x
0,5M NaPO4 pH 7,3	90 mM	1,8 mL	270 mM	5,4 mL
0,3M KCl	5 mM	1 mL	15 mM	3 mL
0,5M Hepes pH 7,3	50 mM	166,6 µL	150 mM	499,8 µL
50mM CaCl2	0,15 mM	30 µL	0,45 mM	90 µL
Água		7 mL		1 mL

As placas foram incubadas a 26°C por 7 a 10 dias e o crescimento dos parasitos monitorado em intervalo de 2 dias a partir do 5º dia pela observação em microscópio invertido. Para cada cepa foram selecionados aleatoriamente 10 clones para continuidade dos experimentos. Os parasitos clonados foram repassados para tubos

contendo meio Schneider suplementado com 15% de SBF e 50 $\mu\text{g/mL}$ de G418 para expansão dos parasitos.

Após o primeiro teste de expressão da β -galactosidase (duas semanas de cultivo), os parasitos passaram a ser cultivados em meio Schneider suplementado com 10% SBF e 100 $\mu\text{g/mL}$ de G418. Essa concentração de antibiótico foi aumentada para 300 $\mu\text{g/mL}$ nos clones selecionados para a realização do trabalho.

O laboratório de Protozoologia possui nível de biossegurança 2, com certificado de biossegurança CQB 101/99.

3.4 Expressão da β -galactosidase

Para avaliar a linearidade da expressão da β -galactosidase, as formas promastigotas transfectadas cultivadas em meio Schneider foram lavadas com tampão fosfato (PBS) pH 7,4 e foram plaqueadas em placas de 96 poços em concentrações decrescentes conhecidas, começando em 100.000 parasitos/poço e finalizando em aproximadamente 50 parasitos/poço, em um volume total de 100 μL . Para tanto, 25 μL de solução contendo 500 μM de CPRG (Chlorophenolred- β -D-galactopyranoside) (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA) e o detergente NP-40 (Nonidet P-40) (Amresco, OH) a 0,5% (v/v) diluídos em PBS pH 7,4 foi adicionado a cada poço. A placa foi incubada a 37°C ao abrigo da luz por 16 horas e a absorbância, medida a 570 nm com valor de referência em 630 nm em espectrofotômetro Tecan Modelo Infinite M200 e os dados obtidos foram analisados por regressão linear.

Após clonagem, foi realizado um ensaio de linearidade da expressão dos clones na concentração de 20.000 parasitos/poço, para

seleção de cinco clones de cada cepa com maior expressão da enzima foram selecionados para dar continuidade ao trabalho. Com os cinco clones selecionados foi feito um teste de linearidade da expressão da enzima como descrito anteriormente. Após esse teste, foram selecionados os dois clones com maior expressão e linearidade da expressão para dar prosseguimento ao trabalho.

Adicionalmente, a manutenção da expressão da β -galactosidase, foi avaliada em parasitos mantidos na presença ou ausência de G418 durante 12 semanas.

3.5 PCR para confirmação de integração do plasmídeo

Nos cinco clones escolhidos após a triagem inicial da expressão foi realizada uma PCR para confirmação da integração do plasmídeo. Foram utilizados os iniciadores senso A1432F (5'-GCATGGCGATGCCTGCTTGC-3'), que está voltado para o gene SSU, local de integração do plasmídeo na *Leishmania*, e antisenseo F3002R (5'-CTGCAGGTTACCTACAGCTAC-3'), voltado ao gene da Neomicina, presente no plasmídeo pLEXSY. Esse conjunto de iniciadores amplificam um produto de 2,1 kpb quando o plasmídeo está integrado no DNA do parasito. A reação de amplificação foi realizada em um volume final de 10 μ L contendo 10 pmol dos iniciadores, 0,2 mmol de dNTPs, Taq DNA polimerase e 30 ng/mL de DNA, nas seguintes condições: desnaturação inicial a 95°C / 2 minutos, seguido de 35 ciclos a 95°C / 30 segundos, 53°C / 1 minuto, 72°C / 2 minutos e um ciclo de extensão final a 72°C / 7 minutos.

Foi feita uma eletroforese em gel de agarose 1% com os produtos

de PCR. A amplificação de um produto de aproximadamente 2,1 kpb indica que o plasmídeo foi integrado no DNA genômico do parasito.

3.6 Caracterização biológica da cepa transfectada

Nos dois clones de cada cepa com expressão estável de β -galactosidase e nos quais foi confirmada a integração do plasmídeo no genoma, foi feita uma análise da manutenção das características biológicas quando comparados à cepa parental.

Para tanto, 5×10^6 parasitos/mL dos clones transfectados e da cepa parental foram cultivados em garrafas contendo 5 mL de meio Schneider completo e realizada a contagem diária do número de parasitos em câmara de Neubauer e determinação da curva de crescimento dos parasitos. Cada experimento foi realizado em duplicata ou triplicata.

Foi feita também uma infecção em camundongos Balb/c, em que 4×10^5 parasitos/mL de quarto dia de cultivo foram inoculados nas patas traseiras do animal, sendo que na pata traseira direita foi inoculado o clone e a pata traseira esquerda, o parasito parental. Os animais foram mantidos no biotério do Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia (CCB/UFSC) e ambiente a $22 \pm 2^\circ\text{C}$, em um ciclo de luz e escuro de 12:12h e tratados com ração e água *ad libitum*. O desenvolvimento das lesões foi acompanhado por 90 dias. Após o término do experimento, os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e os fragmentos da lesão macerados e inoculados em meio Schneider para a recuperação dos parasitos.

O uso de animais neste projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética

para Uso de Animais da UFSC (CEUA – UFSC), sob o protocolo PP00847.

3.7 Padronização da infecção *in vitro*

A infecção *in vitro* foi realizada conforme protocolo já estabelecido no laboratório de Protozoologia para infecção em células THP-1 por *L. (L.) amazonensis*. Resumidamente, células THP-1 foram diferenciadas em macrófagos aderentes, através da utilização de 100 ng/mL de Forbol-12-miristato-13-acetato (PMA) (Sigma-Aldrich Co., St Louis, MO, USA) em uma proporção de 3×10^5 células/poço em placa de 96 poços. As células foram incubadas a 37°C por 72 horas para completa diferenciação celular (Schwende et al, 1996). Promastigotas metacíclicos de 4º dias foram centrifugados a 1.500 x g por 10 minutos, lavados com PBS e suspensos em meio RPMI sem soro; 4×10^6 parasitos/mL foram opsonizados com soro humano AB+ por 1 hora a 34°C, agitando-se o tubo a cada 20 minutos. Após período de opsonização, os parasitos foram centrifugados e suspensos em meio RPMI sem soro (ROMERO et al., 2010).

Para a padronização para *L. (V.) braziliensis* foram utilizadas promastigotas de 4º dia de cultivo em concentrações de 5 parasitos/célula, 10 parasitos/célula e 20 parasitos/célula. Os parasitos foram incubados com as células nas concentrações mencionadas em um volume de 100 µL/poço a 34°C/5% CO₂ por 3 horas. Após esse período, os parasitos não aderidos ou interiorizados foram retirados por 3 lavagens com PBS. A seguir, 200 µL de meio RPMI completo foi adicionado a cada poço e as placas incubadas a 34°C por 72 horas.

Após a incubação, o meio foi removido e uma placa infectada com a cepa parental e uma placa infectada com a cepa transfectada foram fixadas em metanol por 1 minuto e coradas com o corante de Giemsa por 20 minutos. Uma placa infectada com a cepa transfectada foi incubada com 250 μ L de PBS, contendo 100 μ M de CPRG e 0,1% (v/v) de NP-40. A reação foi desenvolvida por 16 horas a 37°C e lida a 570nm com referência em 630nm em equipamento Tecan Modelo Infinite M200.

As placas coradas foram analisadas em microscópio invertido, onde o número de células infectadas e o número de amastigotas intracelulares foram determinados em 300 células contadas aleatoriamente para a obtenção do índice parasitário (IP), conforme Sereno e colaboradores (2001), de acordo com a equação 1. O índice parasitário da placa utilizada para o ensaio colorimétrico foi calculado a partir da absorbância obtida, conforme descrito na equação 2.

Equação 1 – Cálculo do índice parasitário, conforme descrito por Sereno e colaboradores (2001)

$$IP = (1 - \text{Amastigotas/célula} \times \% \text{ de células infectadas}) \times$$

Equação 2 – Cálculo do índice parasitário após leitura das absorbâncias.

$$IP = [1 - (\text{Abs poço infectado} - \text{Abs poço sem infecção})] \times 100$$

Os dados foram analisados pelo programa Graphpad Prism 5.03® (San Diego, USA), para a correlação dos resultados de contagem microscópica entre a cepa transfectada e a cepa parental e a correlação entre a contagem microscópica e a leitura da densidade óptica da cepa transfectada. Os experimentos foram realizados em duplicata com três réplicas.

3.8 Susceptibilidade aos fármacos

Para determinar se a inserção de um gene exógeno no DNA genômico dos parasitos interfere na sua sensibilidade aos fármacos padrão, foi realizada uma infecção *in vitro* como descrito no item 3.7. Após 24 h de infecção, as placas de células THP-1 infectadas foram tratadas com concentrações crescentes dos fármacos leishmanicidas glucantime (4,6 µg/mL a 300 µg/mL), anfotericina B (0,13 µM a 8 µM), pentamidina (1,88 µM a 120 µM), miltefosina (1,25 µM a 80 µM) e paromomicina (3,13 µM a 200 µM). As placas foram incubadas a 34°C por 48 horas e, após esse período, uma placa de cada clone e uma placa da cepa parental foram coradas pelo método de Giemsa e uma placa de cada clone foi tratada com 250 µL de solução de CPRG, como descrito anteriormente. Foi feita reposição de glucantime a cada 24 horas, conforme descrito por Menezes (2014).

O índice parasitário das infecções foi utilizado para calcular a CI₅₀ (concentração inibitória de 50%) e para comparar os resultados da contagem microscópica e do teste colorimétrico e ambas com o resultado da susceptibilidade com a cepa padrão, através de ANOVA de uma via, seguido por teste de Tukey. Os experimentos foram realizados

em triplicata com três réplicas.

Também foi feito um teste para determinação da CC_{50} (concentração de toxicidade celular de 50%) desses fármacos em células THP-1 diferenciadas em macrófagos. Foram diferenciadas 4×10^4 células/poço como já descrito, após diferenciação as células foram tratadas com concentrações crescentes dos fármacos leishmanicidas glucantime (40 $\mu\text{g/mL}$ a 3.000 $\mu\text{g/mL}$), anfotericina B (0,63 μM a 40 μM), pentamidina (9,38 μM a 600 μM), miltefosina (6,25 μM a 400 μM) e paromomicina (15,63 μM a 1000 μM) e incubadas a 37°C por 72 horas. Após a incubação, o meio de cultura foi aspirado e as células tratadas com 50 μL de solução contendo 4mg/mL de MTT (Sigma-Aldrich, St Louis). As placas foram incubadas a 37°C ao abrigo da luz por 4 horas e depois centrifugadas (1.400 rpm / 10 minutos). O sobrenadante foi retirado e os cristais de sal de formazan foram solubilizados em DMSO (100 μL /poço) por 1 hora a 37°C. A densidade óptica foi determinada a 540 nm no equipamento Tecan. Os experimentos foram realizados em duplicata com três réplicas.

Os valores de CI_{50} e CC_{50} foram calculados plotando-se curvas concentração-resposta em um modelo de regressão não linear no programa Graphpad Prism 5.03.

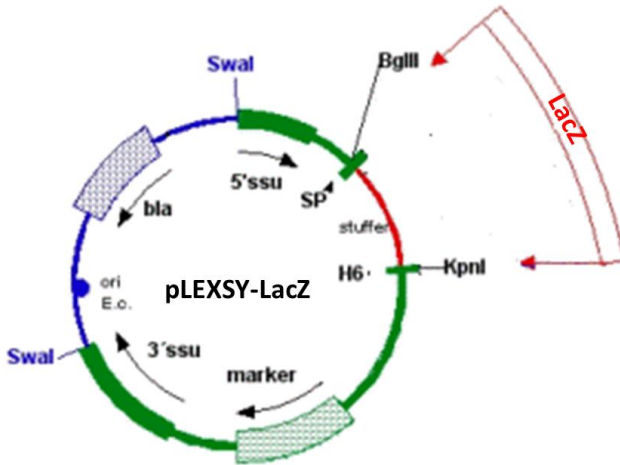
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Construção do vetor e transfecção de parasitos

O gene *LacZ* amplificado via PCR foi clonado no plasmídeo pLEXSY e utilizado para transformar *E. coli* DH5 α . As colônias resultantes da ligação foram avaliadas para a presença do inserto através de PCR de colônia utilizando o iniciador antisense para o gene *LacZ* (LacZR) e o iniciador sense específico para o vetor (A1432F) que amplifica o gene da neomicina.

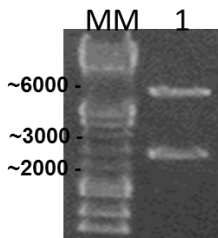
O plasmídeo resultante pLEXSY-*LacZ* (Figura 6) foi linearizado com a enzima de restrição *SwaI* para transfecção. Quando linearizado, o pLEXSY libera um fragmento de DNA de aproximadamente 2,9kpb (figura 7), correspondente à parte de expressão em procarioto. Assim, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% para confirmar a digestão completa do plasmídeo e realizar a purificação do fragmento correspondente ao pLEXSY-*LacZ* de aproximadamente 6 kpb.

Figura 6 – Mapa do plasmídeo pLEXY-LacZ – Esquema representando o plasmídeo pLEXY-LacZ. Em vermelho, onde foi inserido o gene LacZ, em azul a parte correspondente ao sítio de expressão em bactéria que é retirado na linearização com a enzima Swal, em verde os sítios de integração no genoma do parasito.



Fonte: http://www.jenabioscience.com/images/1b94dca880/Newsletter_LEXY_Nov07.html. Acesso em 02/10/2015 às 10:59

Figura 7 - Digestão completa do plasmídeo pLEXY-LacZ – Eletroforese de DNA em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo. Marcador de Massa Molecular (MM) DNA de bacteriófago λ com a enzima de restrição *Hind*III e (1) digestão completa do plasmídeo pLEXY-LacZ pela enzima de restrição Swal liberando um fragmento de aproximadamente 2,9kpb.

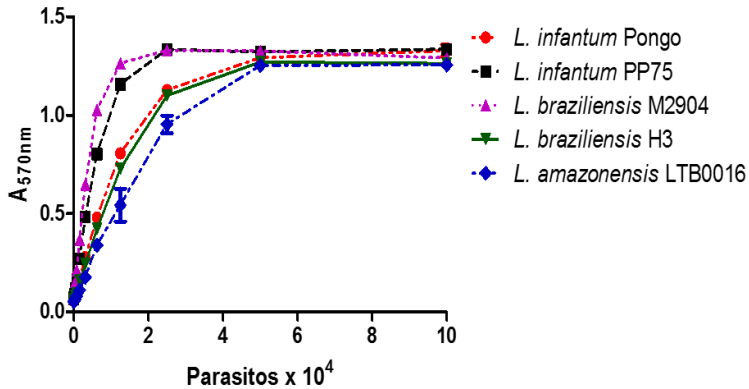


O DNA plasmidial purificado foi utilizado para a transfecção de promastigotas de *Leishmania* por eletroporação. Parasitos transfectados foram cultivados em meio Schneider e a partir de 24 horas a população, contendo o plasmídeo, foi selecionada utilizando o antibiótico G418 em concentrações crescentes de antibiótico (15µg/mL a 300µg/mL). A partir do quinto subcultivo, os parasitos começaram a expressar a enzima β-galactosidase.

4.2 Clonagem das cepas de *Leishmania* expressando β-galactosidase

Antes da realização da clonagem, as cepas padrão *L. (V.) braziliensis* M2904 e H3, *L. amazonensis* LTB 0016 e *L. infantum* PP75 e Pongo foram avaliadas com relação à expressão da enzima β-galactosidase, utilizando diferentes concentrações de parasitos para determinação da linearidade da expressão. Os níveis de expressão de β-gal das cepas transfectadas com o gene LacZ estão mostrados na figura 8. Não foram observadas diferenças significativas ($p < 0,05$) na expressão da enzima entre as populações parentais.

Figura 8 – Expressão de β -galactosidase em promastigotas das cepas parentais de *Leishmania* sp. – Expressão de β -galactosidase nas cepas parentais de *Leishmania* sp.. Os pontos representam a média \pm desvio padrão de um experimento feito em duplicata. A absorbância foi medida no aparelho Tecan a 630nm.



Foi possível detectar o sinal a partir de 390 parasitos/poço no caso da *L. (V.) braziliensis* M2904. Para *L. (V.) braziliensis* H3 e *L. (L.) infantum* Pongo, essa detecção foi feita a partir de 1.560 parasitos/poço. *L. (L.) infantum* PP75 teve sua detecção possível a partir de 780 parasitos/poço e a cepa *L. (L.) amazonensis* LTB0016 foi a que teve menor capacidade de detecção, sendo possível a detecção a partir de 6.250 parasitos/poço.

Diferenças de detecção podem existir devido a variações no número de cópias de plasmídeo presentes em cada parasito (MONTE ALEGRE; OUAISSI; SERENO, 2006), mas também podem estar relacionadas ao nível de expressão do local ao qual o gene repórter foi ancorado, sendo assim, uma consequência do local de transfecção (SOYSA; CARTER; YATES, 2014). Parasitos do gênero *Leishmania*

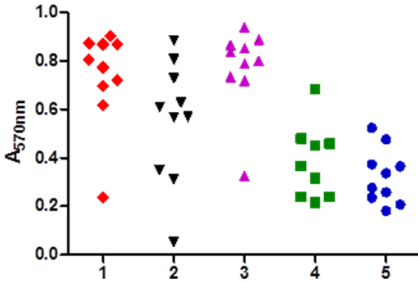
possuem grande diversidade populacional interespecífica e intercepas, sendo que as cepas são compostas por populações multiclonais de parasitos com grande heterogeneidade em aspectos genéticos e fenotípicos (MENDEZ et al., 2001; GARIN, et al., 2011). O sinal produzido pelo produto de expressão depende do número de cópias do plasmídeo que cada célula recebeu e essa diferença pode mascarar o efeito de um composto ativo (MONTE-ALEGRE; OUAISSI; SERENO, 2006). Para diminuir esse viés, é possível isolar uma população clonal que reproduza os mesmos comportamentos biológicos da cepa parental, o que excluiria variantes inerentes da heterogeneidade de expressão e virulência dos parasitos, além de tornar possível a escolha de clones que possuam um nível adequado e homogêneo de expressão do gene de interesse.

Os parasitos foram então clonados por diluição limitante em placas de 96 poços contendo ágar sangue e após 10 dias a 26°C, 10 clones de cada cepa de *Leishmania* foram selecionados aleatoriamente e cultivados.

Após duas semanas de cultivo, 2×10^5 parasitos de cada clone foram retirados, lavados e testados para a expressão de β -galactosidase. Os cinco clones de cada cepa que tiveram a maior leitura de absorbância (expressão de β -galactosidase) foram utilizados para a etapa seguinte do trabalho e os outros clones foram descartados.

Os resultados mostraram uma grande variação na expressão entre os clones de uma mesma cepa e também entre as cepas transfectadas, conforme mostrado na figura 9. O gráfico representa a média de dois experimentos.

Figura 9 – Absorbância dos clones de *Leishmania* sp. – Diferenças nos valores de expressão da enzima β -galactosidase nos clones de (1) *L. (L.) infantum* PP75; (2) *L. (L.) infantum* Pongo; (3) *L. (V.) braziliensis* M2904; (4) *L. (V.) braziliensis* H3 e (5) *L. (L.) amazonensis* LTB0016. A absorbância foi lida em aparelho Tecan a 630nm.



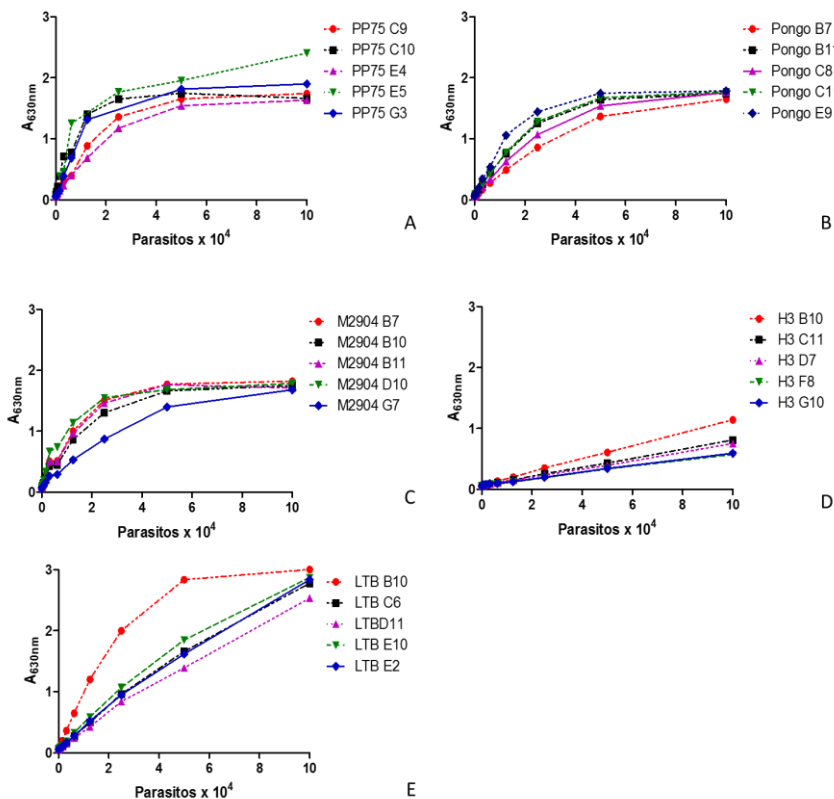
Clones com absorbância menor que 0,30 foram excluídos e os demais, foram selecionados os cinco clones com maior valor de absorbância para cada espécie. Com os cinco clones selecionados para a continuação do trabalho, foi realizado um teste de linearidade da expressão da β -galactosidase.

A expressão da β -galactosidase foi analisada por regressão linear e os clones com maior expressão de cada cepa foram escolhidos para as etapas seguintes. Os clones B10 e E10 de *L. (L.) amazonensis* LTB 0016, B7 e D10 de *L. (V.) braziliensis* M2904, B11 e E9 de *L. (L.) infantum* Pongo e os clones C10 e E5 de *L. (L.) infantum* PP75. Nenhum clone de *L. (V.) braziliensis* H3 mostrou expressão linear suficiente para a detecção em um teste colorimétrico, portanto, essa cepa não foi utilizada nos testes seguintes.

Na figura 10 estão representados os valores de absorbância dos diferentes clones de cada cepa em relação às diferentes concentrações de promastigotas utilizadas em cada ensaio. Os ensaios foram feitos em

triplicata com duas réplicas.

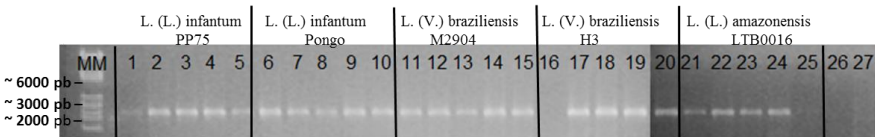
Figura 10 – Gráficos de expressão da β -galactosidase dos clones das diferentes espécies de *Leishmania* - Expressão da β -galactosidase dos diferentes clones de (A) *L. infantum* PP75, (B) Pongo, (C) *L. braziliensis* M2904, (D) H3 e (E) *L. amazonensis* LTB0016. Absorbância lida em aparelho Tecan a 630nm.



Para avaliar a integração do plasmídeo no genoma da *Leishmania*, foi feita uma PCR utilizando iniciadores voltados para a região do gene SSU, onde o plasmídeo deve integrar, e para o gene da

neomicina, presente no plasmídeo. Assim, a presença de amplificação do DNA indica que o plasmídeo foi corretamente integrado no genoma. O resultado da PCR para cada clone selecionado nas diferentes cepas está mostrado na figura 11.

Figura 11 – Confirmação da integração do plasmídeo pLEXSY-LacZ no genoma de *Leishmania* sp. - Eletroforese em gel de agarose 1% corado com brometo de etídeo confirmando a integração do plasmídeo pLEXSY-LacZ no genoma de (1-5) *L. (L.) infantum* PP75; (6-10) *L. (L.) infantum* Pongo; (11-15) *L. (V.) braziliensis* M2904; (16-20) *L. (V.) braziliensis* H3; (21-25) *L. (L.) amazonensis* LTB0016 através de banda característica de 2,1kpb. Todos os parasitos apresentaram a banda característica de integração exceto os clones dos poços 16 e 25. Padrão de Massa Molecular (MM) DNA do bacteriófago λ digerido com a enzima de restrição *Hind*III. Poços 26 e 27 representado os controles negativos da PCR.



Após a certificação da integração do gene os parasitos foram crescidos na presença e ausência de G418 e realizado um ensaio quantitativo de expressão nos clones selecionados. O limite inferior de expressão de β -galactosidase para os clones B7 e D10 de *L. (V.) braziliensis* M2904, C10 e E5 de *L. infantum* PP75 foi de 780 parasitos/poço. Para os clones B10 e E10 de *L. amazonensis* LTB0016 foi de 1.562 parasitos/poço e 3.125 parasitos/poço respectivamente. Os clones B11 e E9 de *L. infantum* Pongo tiveram atividade enzimática detectável somente a partir de 1.562 parasitos/poço. Para *L. infantum* PP75 e Pongo o nível de expressão nos clones e na cepa parental foi idêntico. Já para *L. (V.) braziliensis* M2904 a clonagem resultou em um incremento de 2 vezes quando comparados com a cepa parental. O limite de detecção dos clones de *L. amazonensis* LTB0016 foi de 2 a 4

vezes menor que quando comparados à cepa parental. Os limites de detecção antes e depois da clonagem de cada cepa encontram-se sumarizados na tabela 2.

A clonagem é feita para selecionar populações mais homogêneas entre si, melhorando assim o resultado de detecção. No presente trabalho, os clones de *L. (L.) infantum* mantiveram sua detecção a em relação à cepa parental. Os clones de *L. (L.) amazonensis* melhoraram sua detecção em relação à cepa parental em 2 a 4 vezes. Já os clones de *L. (V.) braziliensis* tiveram sua detecção dobrada após a clonagem em relação à cepa parental.

Tabela 2 – Limites inferiores de detecção do número de parasitos antes e após clonagem expressando β -galactosidase

Espécie	Limite de detecção da cepa parental	Limite de detecção após clonagem
<i>L. infantum</i> PP75 clone C10	780	780
<i>L. infantum</i> PP75 clone E5	780	780
<i>L. infantum</i> Pongo clone B11	1.560	1.560
<i>L. infantum</i> Pongo clone E9	1.560	1.560
<i>L. (V.) braziliensis</i> M2904 clone B7	390	780
<i>L. (V.) braziliensis</i>	390	780

M2904 clone D10		
<i>L.amazonensis</i>		
LTB0016 clone B10	6.250	1.562
<i>L.amazonensis</i>		
LTB0016 clone E19	6.250	3.125

Buckner e colaboradores (1996) transfectaram de forma integrativa as cepas Tulahuén e CL de *T. cruzi* com o gene LacZ e demonstraram que o limite de detecção da atividade β -gal foi de 500 parasitos/poço após lise com NP-40. Tonini (2013), utilizando o mesmo plasmídeo construído por Buckner, transfectou de forma episomal a cepa LTB0016 de *L. amazonensis* e mostrou uma detecção de 1.950 parasitos/poço. No presente estudo, o limite inferior de detecção foi de 780 parasitos para *L. infantum* PP75 e um dos clones de *L. (V.) braziliensis*, 2,5 vezes inferior que o demonstrado por Tonini (2013), mas 1,5 vezes maior que o demonstrado por Buckner (1996). A transfecção de parasitos do gênero *Leishmania* tem sido realizada por diferentes autores utilizando distintos genes repórter. Buckner e Wilson (2005) transfectando uma *L. amazonensis* com o plasmídeo contendo o gene da enzima β -lactamase mostraram que o limite de detecção colorimétrica foi de 20.000 parasitos/poço. Roy e colaboradores (2000) utilizando *L. major* e *L. donovani* transfectadas com o plasmídeo contendo o gene da luciferase demonstraram um limite inferior de detecção de 10 parasitos/poço. Apesar da elevada sensibilidade de detecção, ensaios envolvendo a luciferase dependem de reagentes caros e equipamentos de alto custo, o que pode ser um impedimento para a

utilização desse gene em triagens de larga escala (GUPTA; NISHI, 2011). Contrariamente à detecção encontrada por Roy e colaboradores (2000), Soysa e colaboradores (2014) conseguiram detectar um mínimo de 2.000 parasitos utilizando *L. donovani* transfectadas com o plasmídeo contendo o gene da luciferase, Taheri e colaboradores (2015) transfectaram uma cepa de *L. major* com os genes da luciferase e da GFP fusionados e separados por 40pb utilizando o plasmídeo pLEXSY. Os autores relatam um limite de detecção de 1.000 parasitos para a luciferase e 10.000 para a GFP, indicando que a diferença de sensibilidade, nesse caso, não está relacionada a número de cópias e diferenças entre os promotores.

4.3 Análise da manutenção dos parâmetros biológicos das cepas

A inserção de um DNA exógeno pode causar alterações biológicas em um organismo (GUPTA; NISHI, 2011; SERENO et al, 2007; MONTE-ALEGRE; OUAISSI; SERENO, 2006). Para analisar se a inserção de um novo gene não alterou os parâmetros biológicos de cada clone quando comparados à cepa padrão, foi avaliada a curva de crescimento, infecção *in vitro* e *in vivo* e realizado testes de sensibilidade dos parasitos a drogas leishmanicidas padrão utilizadas na clínica.

As curvas de crescimento para cada cepa parental e seus respectivos clones estão mostradas na figura 12.

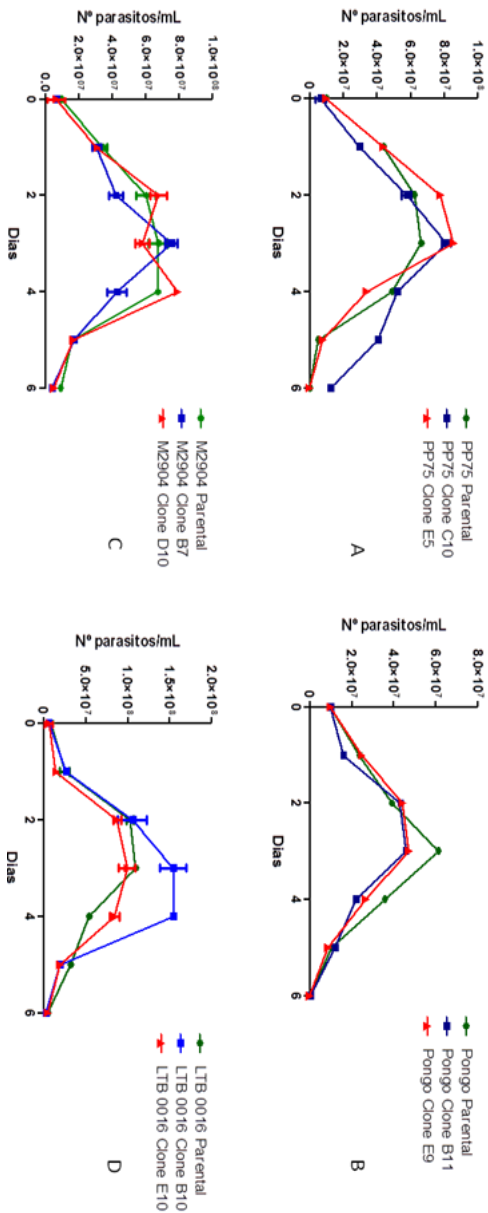


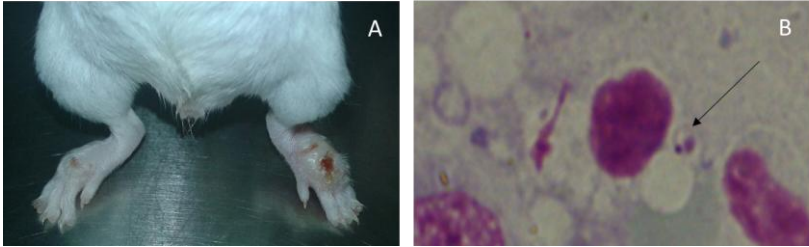
Figura 12 – Curvas de Crescimento de *Leishmania* sp. – Perfil de crescimento de promastigotas das populações selvagens e clones transfectados de: (A) *L. braziliensis* PP75; (B) Pongo; (C) *L. braziliensis* M2904 e (D) *L. amazonensis* LTB0016. Os parasitos partiram de um inóculo inicial de 10^7 parasitos/mL e acompanhados diariamente até o 6º dia de cultivo. Os pontos representam \pm o desvio padrão de dois experimentos em triplicata.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre as curvas de crescimento dos clones quando comparados à cepa parental, indicando que a inclusão do gene *LacZ* não alterou o tempo de duplicação e o crescimento dos parasitos *in vitro*.

Para avaliação da manutenção da infectividade *in vivo* grupos de dois camundongos fêmea Balb/c com 40 dias de nascidos, provenientes do biotério setorial do MIP foram inoculados no coxim plantar traseiro com 10^6 promastigotas de *L. amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, ou por via intra-hepática para *L. infantum* (Pongo e PP75). Durante o período de cronificação, um animal infectado com *L. (V.) braziliensis* M2904 morreu por causas naturais e não foi possível recuperar os parasitos. Os animais foram eutanasiados 90 dias após infecção e as lesões das patas, do fígado e baço foram retirados de forma asséptica para a detecção dos parasitos em esfregaços corados pelo método de Giemsa e cultura em meio Schneider 10% SBF para reisolamento dos parasitos.

Os animais infectados com *L. amazonensis* LTB0016 desenvolveram grandes lesões nas patas inoculadas tanto com a cepa parental como os clones (figura 13 A). Já o animal sobrevivente inoculado com *L. (V.) braziliensis* M2904 mostrou apenas um edema nas patas tanto para a cepa parental como para o clone D10. Os animais infectados com *L. infantum* Pongo e PP75 e seus respectivos clones não mostravam alterações externas bem como na dissecação dos órgãos retirados (fígado e baço) não demonstraram sinais de alteração patológica.

Figura 13 – Lesão em pata de camundongo e esfregaço de pata de camundongo corado pelo método de Giemsa – Fotos representativas de (A) lesão causada por *L. amazonensis* LTB0016 em camundongo Balb/c. Na pata esquerda foi inoculada a cepa parental e na pata direita o clone B10 transfectado com a enzima β -galactosidase. (B) Impressão de pata de camundongo infectado com *L. braziliensis* M2904 cepa parental em lâmina corada pelo método de Giemsa mostrando um amastigota intracelular (seta).



Tonini (2013) acompanhou por 10 semanas o desenvolvimento de lesões provocadas por *L. amazonensis* transfetadas com o gene LacZ e verificou que não houve diferenças no desenvolvimento das lesões entre as cepas transfetadas e parental. Moura (2004) mostrou que o desenvolvimento de lesões provocadas por *L. (V.) braziliensis* na orelha de camundongos Balb/c tem seu máximo desenvolvimento em 5 semanas após a infecção, sendo que após a nona semana de inoculação foi observada a cicatrização total da derme, indicando cura clínica espontânea.

Atualmente não há modelo animal validado para leishmaniose cutânea, apesar de que alguns modelos utilizando ratos, camundongos e hamsters são utilizados em vários laboratórios (MEARS et al, 2015). A falta desse modelo é devido a baixa correlação entre os mecanismos de desenvolvimento da doença entre os animais e humanos, como a apresentação e manifestação da doença, patogenicidade e resposta imune. Poucos trabalhos foram desenvolvidos utilizando infecção de roedores com *L. (V.) braziliensis*. A maior parte dos camundongos são

resistentes a infecções por *L. (V.) braziliensis* devido a inabilidade dessa espécie de inibir a resposta Th1 (MEARS et al, 2015; DEKREY; LIMA; TITUS, 1998). O único modelo que apresenta potencial para ser um bom modelo animal para *L. (V.) braziliensis* é o hamster dourado (*Mesocricetus auratus*) (MEARS et al, 2015; GOMES-SILVA et al, 2013).

Costa e colaboradores (2013) relataram a presença de sintomas graves de leishmaniose visceral em cães após 450 dias de infecção, sendo que os sintomas mais comuns foram o crescimento exacerbado de unhas e linfadenopatia, seguidos de mudanças na pelagem e esplenomegalia. Cruz-Chan e colaboradores (2014) mostraram cura das lesões de pele de cães infectados com *L. mexicana* após 15 semanas de infecção e também relataram leve esplenomegalia em alguns cães nesse período. Rodrigues e colaboradores (2009) relatam o aumento no número de parasitos no baço de camundongos Balb/c infectados com *L. infantum* após 28 dias de infecção e sua diminuição após 56 dias de infecção. No entanto, os autores não relataram mudanças fisiológicas nos animais infectados.

O reisolamento dos parasitos a partir dos órgãos de camundongo não foi possível nas cepas de *L. infantum* e *L. (V.) braziliensis*, contudo, em todos os esfregaços corados foi possível confirmar a infecção para todos os clones, como demonstrado na figura 13 B.

Os parasitos de *L. amazonensis* reisolados de camundongo foram testados para a expressão de β -galactosidase. Ambos os clones expressaram a enzima de maneira semelhante aos parasitos cultivados com a presença de antibiótico de seleção G418.

Como o objetivo dessa padronização é a realização de um ensaio

colorimétrico para a triagem de atividade leishmanicida de compostos para *L. (V.) braziliensis* era importante saber se existia uma correlação entre a metodologia tradicional de contagem microscópica e a detecção da atividade enzimática de amastigotas em células infectadas. Para isso, foram realizados ensaios infectando células THP-1 com inóculos crescentes de *L. (V.) braziliensis* M2904 e após 72 horas foi realizada a contagem em microscópio de 300 células coradas pelo método de Giemsa e a análise colorimétrica. Também foi avaliado paralelamente à infecção de células THP-1 pelas cepas selvagens e transfectadas para determinar se o processo de transfecção alterou ou não a capacidade infectiva e de multiplicação intracelular dos parasitos. A Tabela 3 mostra os inóculos, a porcentagem de infecção e a média de amastigota/célula de cada clone.

Tabela 3 – Taxa de infecção de células THP-1 *in vitro* pela cepa parental e clones de *L. (V.) braziliensis* M2904

Amostra	Inóculo	% de infecção	Média de amastigotas/célula	Absorbância
	20	ND	ND	2,15 ± 0,20
Clone B7	10	88	17,61	2,14 ± 0,02
	5	50	9,13	1,7 ± 0,11
Clone D10	20	ND	ND	1,97 ± 0,22
	10	75,61	10,81	0,87 ± 0,11
	5	50	6,52	0,93 ± 0,09
Parental	20	ND	ND	Não se aplica

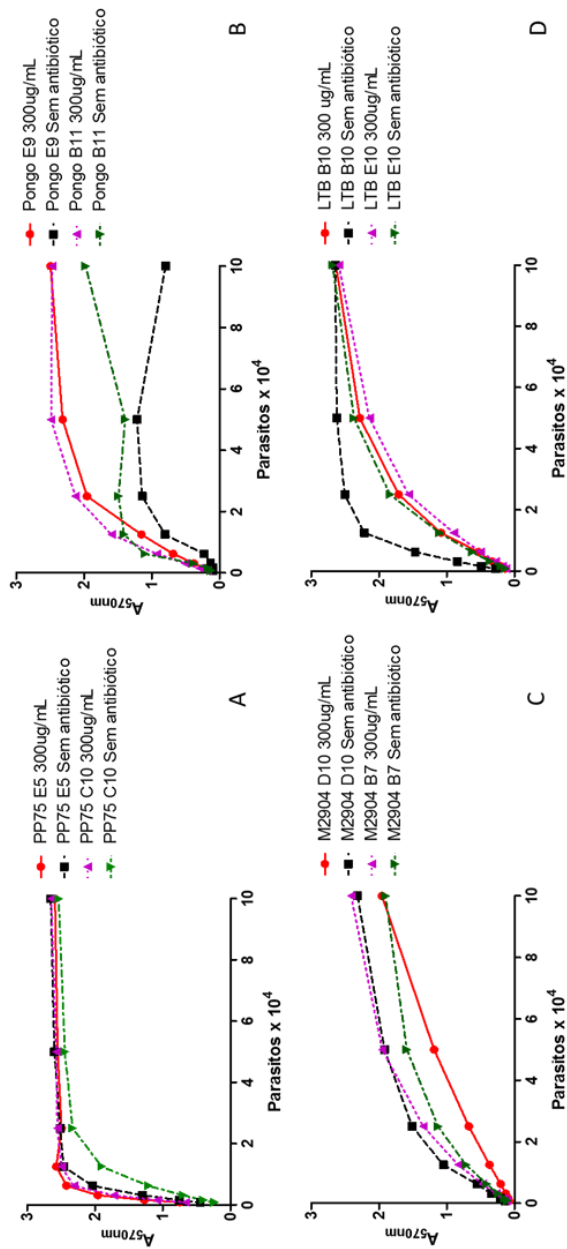
1	79	
0	,66	9,02
5	53	
	,33	7,56

Os resultados mostram que utilizando o inóculo de 10 parasitos/célula, a taxa média de infecção celular foi de 81% com média de 12,5 amastigotas/célula infectada. Já no inóculo de 5 parasitos/célula a taxa média de infecção foi de 51%, com cerca de 7,7 amastigota/célula. O inóculo de 20 amastigotas/célula não foi contado por possuir uma quantidade muito grande de amastigotas/célula e um elevado número de células destruídas, o que leva a grande dificuldade de mensuração e erros de contagem, um dos principais problemas da metodologia clássica.

Adicionalmente ao teste de PCR mostrando a integração do gene LacZ no genoma, os clones transfectados das diferentes cepas foram cultivados por 12 semanas na presença de 300µg/mL de G418 ou ausência do antibiótico e testados quanto ao nível de expressão de β-galactosidase, conforme mostrado na figura 14.

No presente estudo não foram observadas diferenças estatísticas na expressão da enzima em clones mantidos na presença ou na ausência do antibiótico G418. Esse resultado é mais um indicativo da integração do plasmídeo no genoma do parasito, uma vez que não foram observadas quedas na expressão do gene LacZ após 12 semanas de cultivo na ausência da pressão seletiva da droga.

Figura 14 – Expressão da β -galactosidase de parasitos cultivados na ausênça e presença de antibiótico G418 - Expressão da β -galactosidase nos clones de (A) *L. infantum* PP75; (B) Pongo; (C) *L. braziliensis* M2904 e (D) *L. amazonensis* LTB0016 quando os parasitos são cultivados na presença e ausência de antibiótico de seleção G418. Absorbância medida em aparelho Tecan a 630nm.



Tonini (2013), transfectou uma cepa de *L. (L.) amazonensis* com um plasmídeo episomal contendo o gene da β -galactosidase. Ele relatou queda de 70% da atividade da enzima após 10 semanas de cultivo, fazendo-se necessário o uso de quantidades altas de antibiótico para manter a expressão da enzima. Geralmente, plasmídeos episomais são instáveis na ausência da pressão seletiva do antibiótico (CLAYTON, 1999). A diminuição na expressão de genes repórter em *Leishmania* com plasmídeos episomais após passagem *in vivo* ou quando cultivados na ausência de pressão seletiva é um fenômeno relatado com frequência (ROY et al., 2000; OKUNO, et al., 2003; CHAN et al. 2003). Antibióticos podem mudar a biologia do parasito, podendo levar a expressão de genes que, em geral, não estariam expressos, além de tornarem o processo mais oneroso; por isso, a importância de uma transfecção estável sem a presença de antibiótico.

Nesse trabalho, foi utilizado um plasmídeo integrativo para contornar esse viés, sendo possível o cultivo dos parasitos sem antibiótico, corrigido assim o problema encontrado por Tonini (2013).

4.7 Susceptibilidade a fármacos

Como prova de conceito, a susceptibilidade da cepa parental e dos clones de *L. (V.) braziliensis* M2904 foi testada frente a cinco fármacos leishmanicidas (Glucantime, Anfotericina B, Pentamidina, Miltefosina e Paromomicina) utilizados na clínica. Os ensaios foram realizados utilizando-se a metodologia tradicional de contagem em microscópio e a metodologia colorimétrica aqui padronizada.

Para o fármaco glucantime foi encontrada uma CI_{50} de 100,6

$\mu\text{g/mL}$ para a cepa parental; entretanto, os clones transfectados não demonstraram nenhuma atividade em qualquer das metodologias utilizadas (teste colorimétrico e metodologia clássica). Menezes (2014) encontrou uma CI_{50} de $32,5 \mu\text{g/mL}$ para esse fármaco utilizando a mesma cepa de *L. (V.) braziliensis*. Vermeersch e colaboradores (2009) relataram valores de CI_{50} que variaram de $10,2 \mu\text{g/mL}$ a $>64 \mu\text{g/mL}$ para *L. (L.) donovani*. Zauli-Nascimento e colaboradores (2010) obtiveram valores de CI_{50} que variaram de $18,5 \mu\text{g/mL}$ a $112,24 \mu\text{g/mL}$ para isolados clínicos de *L. (V.) braziliensis*. Em células THP-1 diferenciadas, o glucantime apresentou um valor de $\text{CC}_{50} > 3 \text{ mg/mL}$ e um índice de seletividade $> 29,8$.

Para o fármaco anfotericina B foram encontrados valores de CI_{50} que variaram entre $0,65 \mu\text{M}$ a $0,72 \mu\text{M}$, utilizando-se o teste colorimétrico, e de $0,43 \mu\text{M}$ a $0,75 \mu\text{M}$ utilizando-se a metodologia clássica para os clones transfectados. O valor de CI_{50} da cepa parental foi de $1,3 \mu\text{M}$. Os valores de CI_{50} encontrados pelo método colorimétrico foram similares aos encontrados por Vermeersch e colaboradores (2009), que obtiveram um valor de CI_{50} de $0,6$ a $0,7 \mu\text{M}$ utilizando *L. (L.) donovani*. No presente estudo, a anfotericina B obteve um valor de CC_{50} de $9,79 \mu\text{M}$ em células THP-1 diferenciadas, tendo assim um índice de seletividade variando de $22,7$ a $7,5$.

Para o fármaco pentamidina foram encontrados valores de CI_{50} 597 a $625 \mu\text{M}$ utilizando-se o método colorimétrico e 199 a $215 \mu\text{M}$ utilizando-se o método clássico para os clones da cepa transfectada. Para a cepa parental foi encontrado um valor de CI_{50} de $446 \mu\text{M}$. Faria e colaboradores (2013) obtiveram um valor de CI_{50} de $13,0 \mu\text{M}$ para *L.*

(*V. braziliensis* e 3,38 μM para *L. (L.) amazonensis*, doses muito inferiores às encontradas nesse trabalho. Em células THP-1 diferenciadas, foi encontrado um valor de CC_{50} de 85,19 μM , sendo muito abaixo que o valor de CI_{50} , tornando inviável seu uso para essa linhagem celular. O grupo de Faria (2013) encontrou um índice de seletividade de 1,96 utilizando células RAW 264.7.

O fármaco miltefosina apresentou um valor de CI_{50} variando de 28,8 a 34,02 μM para o ensaio colorimétrico e entre 13,8 a 21,32 μM para a metodologia clássica. Com a cepa parental foi encontrado um valor de CI_{50} de 24,9 μM . Sharma e colaboradores (2014) encontraram um valor de CI_{50} de 8,10 μM para *L. (L.) donovani*. Vermeersch e colaboradores (2009) encontraram um valor de CI_{50} de 4,3 μM para *L. (L.) donovani*. Escobar e colaboradores (2002) encontraram valores de CI_{50} de 4,5 μM para *L. (L.) donovani*, 10,12 μM para *L. (V.) mexicana*, 10,63 μM para *L. (V.) panamensis* e 37,17 μM para *L. (L.) major*. No presente estudo foi encontrado valor de CC_{50} de 27,65 μM para células THP-1 diferenciadas, fazendo com o que índice de seletividade variasse de 0,81 a 2,0. Sharma e colaboradores (2014) encontraram um índice de seletividade de 7 utilizando célula Vero.

O fármaco paromomicina, semelhantemente ao glucantime, não demonstrou atividade nos parasitos transfectados, nem utilizando-se o método colorimétrico, nem utilizando-se a metodologia clássica. Foi encontrada para esse fármaco um valor de CI_{50} de 18,06 μM para a cepa parental, valor semelhante ao encontrado por Suryawanshi e colaboradores (2013) para *L. (L.) donovani*. Em células THP-1 diferenciadas, a paromomicina teve um valor de $\text{CC}_{50} > 1000 \mu\text{g/mL}$ para THP-1, tendo um índice de seletividade $> 55,3$.

Os resultados dos testes sugerem que a inserção de um gene exógeno no genoma do parasito suprimiu totalmente a sensibilidade aos fármacos glucantime e paromomicina, mas não teve semelhantes efeitos de supressão de sensibilidade com as demais drogas. Tanto o glucantime quanto a paromomicina não atuam contra a forma promastigotas do parasito, por isso, não foi tentado fazer nenhum ensaio com essa forma para saber se existia atividade nos transfectados.

Os resultados de testes de compostos estão sumarizados na tabela 5.

Tabela 4 – Susceptibilidade da cepa parental de *L. (V.) braziliensis* M2904 e de seus clones expressando a enzima β -galactosidase a fármacos leishmanicida padrão

Clone	Método	Glucantime ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	Anfotericina B (μM)	Pentamidina (μM)	Miltefosina (μM)	Paromomicina (μM)
B7	Clássico		0,409	199,1	21,32	
	Colorimétrico	Não converge	0,7258	625,8	28,81	Não converge

Continuação Tabela 4 – Susceptibilidade da cepa parental de *L. (V) braziliensis* M2904 e de seus clones expressando a enzima β -galactosidase a fármacos leishmanicida padrão

D10	Clássico		0,7502	215,9	13,86	
	Colorimétrico	Não converge				Não converge
			0,6497	597,7	34,02	
Parental		100,6	1,308	446,6	24,97	18,06
Referência		32,5 ¹	0,7 ²	13,0 ³	4,5 – 37,17 ⁴	22,6 ⁵

Fontes: 1 - Menezes, 2014; 2 - Vermeersch et al, 2009; 3 - Faria et al, 2013; 4 - Escobar et al, 2002; 5 - Suryawanshi et al, 2013

O ensaio colorimétrico mostrou resultados semelhantes aos obtidos pela metodologia clássica para os fármacos anfotericina B e miltefosina. Já para a pentamidina foram obtidos resultados discrepantes entre a metodologia clássica e a metodologia colorimétrica, ambos foram bem diferentes do valor padrão encontrado por Faria e colaboradores (2013) que também foram obtidos utilizando *L. (V)*

braziliensis; como o valor do índice de seletividade para esse fármaco em células THP-1 foi muito baixo, esse fármaco não pode ser utilizado como controle no ensaio colorimétrico para triagem de compostos com potencial atividade leishmanicida. Infelizmente, o processo de transfecção alterou a susceptibilidade dos parasitos ao fármaco glucantime, que é o fármaco de primeira escolha para o tratamento de leishmaniose, e ao fármaco paromomicina, invalidando o uso desses dois fármacos como controles no ensaio colorimétrico.

Por levar em consideração todos os parasitos presentes na placa, o teste colorimétrico traz resultados mais confiáveis que a contagem microscópica, na qual são contadas aleatoriamente 100 células/poço em três poços, totalizando 300 células. (BERMAN; WYLER, 1980; NEAL; CROFT, 1984; BERMAN; LEE, 1984; SERENO et al., 2007). A contagem manual é laboriosa e está sujeita a erros de resultados, uma vez que pode-se contar campos mais ou menos infectados e, quando a infecção é muito alta, pode-se errar na contagem do número de parasitos intracelulares. Além disso, a contagem manual não leva em consideração morte ou replicação celular, o que também pode resultar em erros de interpretação (CROFT; SEILFERT; YARDLEY, 2006; GUPTA; NISHI, 2011).

Paralelamente a este trabalho, foi testada a atividade leishmanicida de 222 amostras disponibilizadas por diferentes pesquisadores de universidades brasileiras contra *L. (L.) amazonensis*, utilizando um protocolo previamente desenvolvido, padronizado e implementado no Laboratório de Protozoologia (TONINI, 2013). Os compostos testados eram de origem natural (180, 81,08%) ou sintética (42, 18,9%).

Parte destes resultados está publicada na Revista Brasileira de Farmacognosia, em artigo intitulado “Chromenes from leaves of *Calea pinnatifida* and evaluation of their leishmanicidal activity” em anexo (Apêndice 1). Outros resultados foram apresentados no XI Congresso Latinoamericano de Botânica (Apêndice 2), nos anais do XXIII Seminário de Iniciação Científica da UFMT (Apêndice 3) e um resumo foi publicado na Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada (Apêndice 4). Atualmente, outro artigo se encontra em preparação.

5 Conclusões

✓ Três espécies de *Leishmania* foram transfectadas de maneira integrativa com o gene LacZ que codifica para a enzima β -galactosidase.

✓ Foram produzidos clones de *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum* expressando de forma estável a enzima β -galactosidase.

✓ A clonagem das cepas melhorou entre 2 e 4 vezes o sinal de detecção dos parasitos em relação a cepa parental transfectada para os clones de *L. (L.) amazonensis*.

✓ A adição do gene exógeno ao genoma dos parasitos não alterou as características biológicas de crescimento e infectividade dos parasitos *in vitro* e *in vivo*.

✓ A transfecção alterou o perfil de sensibilidade dos clones de *L. (V.) braziliensis* seleccionados a dois dos cinco fármacos testados.

✓ Foi validado um teste colorimétrico para triagem de compostos com resultados semelhantes aos obtidos utilizando a metodologia clássica.

6 Referências Bibliográficas

ALTAMIRANO-ENCISCO, AJ et al. Sobre a origem e dispersão das leishmanioses cutânea e mucosa com base em fontes históricas pré e pós-colombianas. **História, Ciências e Saúde – Manguinhos**, v. 10 n. 3 p. 853-882, 2003 disponível em

http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0365-05962005000400015

ALVAR, J, CROFT, S, OLLIARO, P. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. **Adv. Parasitol.** v. 61 p. 223–274, 2006 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16735166>

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clin. Exp. Dermatol.** v. 35, n. 7, p. 699-705, 2010 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20831602>

ASHUTOSH et al. Use of *Leishmania donovani* field isolates expressing the luciferase reporter gene in in vitro drug screening. **Antimicrob Agents Chemother** v. 49, p. 3776-3783, 2005 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16131481>

BERMAN, JD, LEE, LS. Activity of antileishmanial agents against amastigotes in human monocyte-derived macrophages and in mouse peritoneal macrophages. **Journal of Parasitology**, v. 70 n. 2 p. 220-225, 1984 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6088749>

BOELAERT, M; SUNDAR, S. Leishmaniasis. In FARRAR, J et al. **Manson's Tropical Diseases** 23. ed. Editora Elsevier. cap. 47 p. 631-651 disponível em <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780702051012000480>

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Atlas de Leishmaniose Tegumentar Americana: Diagnósticos clínico e diferencial. **Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica**, Brasília, DF, 2006 disponível em http://bvsm.s.saude.gov.br/bvs/publicacoes/atlas_lta.pdf

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Fundação Nacional de Saúde. Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana. 5ª ed. **Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde**. Brasília, 2000 disponível em http://www.saude.pr.gov.br/arquivos/File/zoonoses_intoxicacoes/leishmaniose/manu_leishman.pdf

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Secretaria de Vigilância em Saúde, 2 ed. Brasília, **Editora do Ministério da Saúde**, 2013 disponível em http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_2ed.pdf

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Secretaria de Vigilância em Saúde, 1 ed. Brasília, **Editora do Ministério da Saúde**, 2010 disponível em http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_americana.pdf

BRITO, MEF, ANDRADE, MS, DANTAS-TORRES, F, RODRIGUES, EHG, CAVALCANTI, MP, ALMEIDA, AMP, BRANDÃO-FILHO, SP. Cutaneous leishmaniasis in northeastern Brazil: a critical appraisal of studies conducted in state of Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical** v. 45 n. 4 p. 425-429, 2012 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22836662>

BUCKNER, FS et al. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing β -galactosidase. **Antimicrob. Agents Chemother.** v. 40, n. 11, p. 2592-2597, 1996 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8913471>

BUCKNER, FS, WILSON, AJ. Colorimetric assay for screening compounds against *Leishmania* amastigotes grown in macrophages. **Am J Trop Med Hyg** v. 72, p. 600-605, 2005 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15891135>
CALLAHAM, HL et al. Axenic amastigote system for drug screening. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 41, p. 818-822, 1997 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9087496>

CHAN, MM et al. A microplate assay for *Leishmania amazonensis* promastigotes expressing multimeric green fluorescent protein. **Parasitol. Res.** v. 89, n. 4, p. 266-271, 2003 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12632163>

CHANGSEN, C, FRAZBLAU SG, PALITTAPONGAMPIM, P. Improved green fluorescent protein reporter-gene-based microplate screening for tuberculosis compounds by utilizing an acetinamidase promoter. **Antimicrob Agents Chemother** v. 47, p. 3682-3687, 2003 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14638465>

CLAYTON, CE. Genetic manipulation of kinetoplastida. **Parasitol. Today.** v. 15, n. 9, p. 372-378, 1999 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10461166>

CLEM, A. A current perspective on leishmaniasis. **J. Glob. Infect. Dis.** v. 2, n. 2, p. 124-126, 2010 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20606967>

CORRALES, RNR et al. Synthesis and Antileishmanial Activity of Lipophilic Aromatic Aminoalcohols. **The Scientific World JOURNAL**, v. 10, p. 1067–1072, 2010 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20563528>

COSTA, DJ et al. Experimental infection of dogs with *Leishmania* and saliva as model to study canine visceral leishmaniasis. **PLoS One** v. 8, n. 4, doi: 10.1371/journal.pone.0060535, 2013 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23577121>

COSTA, JML. O uso clínico das pentamidinas com especial referência nas leishmanioses. **Acta Amazônica** v. 23, p. 163-172, 1993 disponível em <http://www.scielo.br/pdf/aa/v23n2-3/1809-4392-aa-23-2-3-0163.pdf>

COX, FEG. History of human parasitology. **Clin. Microbiol. Rev.** v. 15 n. 4 p. 595-612, 2002 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12364371>

CROFT, SL, OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy: Challenges and opportunities. **Clin Microbiol Infect** V. 17, n. 10, p. 1478-1483, 2011 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21933306>

CROFT, SL, SEILFERT, K, YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian, J Med Res**, v. 123, p. 399-410, 2006 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16778319>

CROFT, SL, YARDLEY, V. Chemotherapy of leishmaniasis. **Curr. Pharmac. Design**. v. 8, n. 4, p. 319-342, 2002 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11860369>

CROFT, SL. In vitro screens in the experimental chemotherapy of leishmaniasis and trypanosomiasis. **Parasitology Today** v.2, n. 3, p. 64-69, 1986 disponível em www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15462773

CROFT, SL; COOMBS, GH. Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitol**. v. 19, n. 11, p. 502-508, 2003 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14580961>

CROFT, SL; SUNDAR, S; FAIRLAMB, AH. Drug resistance in leishmaniasis **Clinical Microbiology Reviews** v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16418526>

CRUZ-CHAN, JV et al. A canine model of experimental infection with *Leishmania (V.) mexicana*. **Parasites & Vectors** v. 7, 2014 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25108307>

CUNNINGHAM, AC. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Exp. Mol. Pathol**. v. 72, n. 2, p. 132-141., 2002 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11890722>

DEKREY GK, LIMA HC, TITUS RG. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. **Infect Immun**. V. 66, n. 2, p. 827-829, 1998 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9453649>

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology & Infectious Diseases**. V. 27 p. 305-318, 2004 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15225981>

DOSRKY, DI, WELLS, M, HARRINGTON, RD. Detection of HIV-I infection with a green fluorescent protein reporter system **J Acquir**

Immune Sefic Syndr Hum Retroviral v. 13, p.307-313, 1996
disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8948367>

ESCOBAR, P et al. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (iltefosine), ET-18-OC11 (edelfosine) and amphotericin B. **Acta Trop** v. 81, p. 151-157, 2002 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11801222>

FARIA, JV et al. Synthesis and activity of novel tetrazole compounds and their pyrazole-4-carbonitrile precursors against *Leishmania* spp. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** v. 23, p. 6310-6312, 2013 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24125880>

FUMAROLA, L, SPINELLI, R, BRANDONISIO, O. In vitro assays for evaluation of drug activity against *Leishmania* spp. **Res. Microb.** v. 155, n. 4, p. 224-230, 2004 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15142618>

GARIN, Y. J. et al. Virulence of *Leishmania infantum* is expressed as a clonal and dominant phenotype in experimental infections. **Infect. Immun.** v. 69, n. 12, p. 7365-7373, 2011 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11705909>

GOMES-SILVA, A et al. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. **Parasitology** v. 140, p. 771-779, 2013 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23369503>

GONTIJO, B, CARVALHO, MLR. Leishmaniose Tegumentar Americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 36, n.1, p. 71-80, 2003 disponível em <http://scielo.br/pdf/rsbmt/v36n1/15310.pdf>

GONZALEZ, U et al. Vector and reservoir control for preventing leishmaniasis. **The Cochrane Collaboration** v. 8, doi: 10.1002/14651858.CD008736.pub.2, 2015 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26246011>

GOTO, H, LINDOSO, JAL. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert. Rev. Anti. Infect. Ther.** v. 8, n. 4, p. 419-433, 2010 disponível em

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20377337>

GUPTA, S.; NISHI. Visceral leishmaniasis: experimental models for drug discovery. **Indian J. Med. Res.** n. 133, p. 27-39, 2011 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21321417>

HARHAY, MO et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends Parasitol.** v. 27, n. 9, p. 403-409, 2011 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21596622>
<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26334763>

KAMAU, SW, GRIMM, F, HEHL, AB. Expression of green fluorescent protein as a marker for effect of antileishmanial compounds in vitro. **Antimicrobial Agents Chemother** v. 45, p. 3654-3656, 2001 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11709363>

KAYSEL-CRUZ, A et al. Current treatment and drug discovery against *Leishmania* spp. and *Plasmodium* spp.: A Review. **Cur. Drug. Targ.** v. 10, n. 3, p. 178-192, 2009 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19275555>

KEDZIERSKI, L, EVANS, KJ. Immune responses during cutaneous and visceral leishmaniasis. **Parasitology** v. 141 p. 1544-1562, 2014 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25075460>

KEVRIC, I; CAPPEL, MA; KEELING, JH. New world and old world *Leishmania* infections: A Pratical Review. **Dermatol Clin.** v. 33, p. 579-593, 2015 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26143433>

LAINSON, R.; RANGEL, E. F. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 100, n. 8, p. 811-827, 2005 disponível em <http://www.scielo.br/pdf/mioc/v100n8/v100n8a01.pdf>

LANG, T et al. Bioluminescent *Leishmania* expressing luciferase for rapid and high throughput screening of drugs acting on amastigote-harbouring macrophages and for quantitative real-time monitoring of parasitism features in living mice. **Cell Microbiol** v. 7, p. 383-92, 2005 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15679841>

MEARS, ER et al. A Review: The current in vivo models for the discovery and utility of new anti-leishmanial drugs targeting cutaneous leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis** v. 9, n. 9, doi: 10.137/journal.pntd0003889, 2015 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26334763>

MÉNDEZ, S. et al. Correlation between in vitro and in vivo infectivity of *Leishmania infantum* clones. **J. Eukaryot. Microbiol.** v. 48, n. 6, p. 616-621, 2001 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11831769>

MENEZES, JAT. Análise funcional de genes associados ao transporte e ao estresse oxidativo em macrófagos humanos infectados com *Leishmania braziliensis* e tratados com glucantime Tese de doutorado Universidade federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2014 disponível em <http://tede.ufsc.br/teses/PBTC0216-T.pdf>

MONTE-ALEGRE, A, OUAISSI, A, SERENO, D. *Leishmania* amastigotes as targets for drug screening. **Kinetoplastid. Biol. Dis.** v. 5, n. 6, 2006 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17059597>

MOURA, TR. Desenvolvimento de um modelo experimental para leishmaniose tegumentar Americana utilizando *Leishmania braziliensis*. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2004 disponível em https://repositorio.ufba.br/ri/bitstream/ri/10109/1/Disserta%C3%A7%C3%A3o_Med_%20Tatiana%20Moura.pdf

MURRAY, HW, BERMAN, JD, SARAVIA, NG. Advances in leishmaniasis. **Lancet** v. 366 p. 1561-1577, 2005 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16257344>

NEAL, RA, CROFT, SL. An in vitro system for determining the activity of compounds against the intracellular amastigote form of *Leishmania donovani*. **J Antimicrob Chemother**, v. 14, p. 463-475, 1984 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6096347>

OBONAGA, R et al. Treatment failure and Miltefosine susceptibility in dermal leishmaniasis caused by *Leishmania* subgenus *Viania* species.

Antimicrob Agents Chemother, v. 58, n. 1, p. 144-152, 2014
disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24145529>

OKUNO, T et al. Applications of recombinant *Leishmania amazonensis* expressing egfp or the beta-galactosidase gene for drug screening and histopathological analysis. **Exp Anim** v. 52, p. 109-118, 2003 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12806885>

OLLIARO, PL et al. Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980-2004. **Lancet Infect Dis** v.5 p. 763-774, 2005 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16310148>

OMS. Control of the leishmaniasis. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis. Genebra: **World Health Organization**. 2010 disponível em http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf

OMS. Status of endemicity of visceral leishmaniasis, worldwide. Genebra: **World Health Organization**, 2012 disponível em <http://apps.who.int/gho/data/node.main.NTDLEISHVEND?lang=en>

PETERS, W; EVANS, DA; LANHAM, SM. Importance of parasite identification in cases of leishmaniasis. **Journal of the Royal Society of Medicine** v. 76, p. 540-541, 1983 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6876041>

REIMÃO, JQ et al. Generation of a Luciferase-Expressing *Leishmania infantum chagasi* and assessment of miltefosine efficacy in infected hamsters through bioluminescence imaging. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 9, n. 2, doi:10.1371/journal.pntd.0003556, 2015 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25679212>

REITHINGER, R et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis** v.7, p. 581-596, 2007 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17714672>

ROCHA, MN et al. An alternative in vitro drug screening test using *Leishmania amazonensis* transfected with red fluorescent protein. **Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases** v. 75, p. 282-291,

2013 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23312610>

RODRIGUES, OR et al. Identification of regulatory T cells during experimental *Leishmania infantum* infection. **Immunobiology** v. 24, p. 101-111, 2009 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19167988>

ROMERO, I et al. Viability and burden of *Leishmania* in extralesional sites during human dermal leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis** v. 4, n. 9 doi:10.1371/journal.pntd.0000819 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20856851>

ROY, G et al. Episomal and stable expression of the luciferase reporter gene for quantifying *Leishmania* spp. infections in macrophages and in animal models. **Mol Biochem Parasitol** v. 110, p. 195-206, 2000 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11071276>

SAMPAIO, RNR et al. Tratamento com Pentamidina de seis casos de forma mucosa de leishmaniose tegumentar. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 63, p. 439-442, 1988 disponível em <http://www.anaisdedermatologia.org.br/detalhe-artigo/622/Tratamento-com-pentamidina-de-seis-casos-da-forma-mucosa-de-leishmaniose-tegumentar>

SANDS M, KRON MA, BROWN RB. Pentamidine: A Review. **Infectious Diseases** v. 41, p. 187-194, 1985 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/3903942>

SCHWENDE, H et al. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D3. **J Leukoc Biol** v. 59, n. 4, p. 555-561, 1996 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8613704>

SERENO, D et al. Advances and perspectives in *Leishmania* cell based drug-screening procedures. **Parasitol. Intern.** v. 56, n. 1, p. 3-7, 2007 disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17079188>

SERENO, D et al. DNA Transforamtion of *Leishmania infantum* axenic amastigotes and their use in drug screening. **Antimicrob Agents Chemother** v. 45, n. 4, p. 1168-1173, 2001 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11257031>

SERENO, D et al. In vitro antileishmanicidal activity of nicotinamide. **Antimicrob Agents Chemother** v. 49, p. 808-812, 2005 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15673775>

SHARMA, R et al. Triazino indole-quinoline hybrid: a novel approach to antileishmanial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** v. 24, p. 298-301, 2014 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24314395>

SHARMA, U, SINGH, S. Immunobiology of leishmaniasis. **Indian. J. Exp. Biol.** v. 47, n. 6, p. 412-423, 2010 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19634705>

SHIMONYA, O, JAFFE, CL. Rapid fluorescent assay for screening-drugs on *Leishmania* amastigotes. **J Microbiol Methods**, v. 75, p. 196-200, 2008 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18573286>

SILVEIRA, FT et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania* (*V. braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in american cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology** v. 31 p. 423-431, 2009 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19646206>

SINGH, N, DUBE, A. Fluorescent *Leishmania*: application to anti-leishmanial drug testing. **Am J Trop Med Hyg** v. 71, p. 400-402, 2004 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15516633>

SOONG, L; HENARD, CA; MELBY. Immunopathogenesis of non-healing American cutaneous leishmaniasis and progressive visceral leishmaniasis. **Semin Immunopathol** v. 34, p. 735-751, 2012 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23053396>

SOYSA, R; CARTER, NS; YATES, PA. A dual system for analysis of post-transcriptional regulation of gene expression in *Leishmania*. **Mol Biochem Parasitol** v. 195, n. 1, p. 1-5, 2014 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24878002>

SUNDAR, S et al. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. **Clin Infect Dis**, v. 55, n. 4, p. 543-550, 2012 disponível em

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22573856>

SUNDAR, S et al. Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic. **Clin Infect Dis**, v. 31, p. 1104-1107, 2000 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11049798>

SUNDAR, S et al. Injectable paromomycin for visceral leishmaniasis in India. **N Engl J Med**, v. 356, p. 2571-2581, 2007 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17582067>

SUNDAR, S et al. Short-course paromomycin treatment for visceral leishmaniasis in India: 14- days vs 21-day treatment. **Clin Infect Dis**, v. 49, n. 6, p. 914-918, 2009 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19663597>

SUNDAR, S et al. Single-dose liposomal amphotericin B for visceral leishmaniasis in India. **N Engl J Med** v. 362, n. 6, p. 504-512, 2010 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20147716>

SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Trop Med Inst Health**, v. 6, p. 5450-5457, 2001 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11703838>

SURYAWANSHI, SN et al. Synthesis and biological evaluation of a novel series of aryl S,N-ketene acetals as antileishmanial agents. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters** v. 23, p.3979-3982, 2013 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23673014>

TONINI, ML. Desenvolvimento de um teste colorimétrico para triagem da atividade Leishmanicida de compostos utilizando *Leishmania amazonensis* expressando a enzima beta-galactosidase. Dissertação de Mestrado, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2013 disponível em <http://tede.ufsc.br/teses/PBTC0196-D.pdf>

VERMEERSCH, M et al. In vitro susceptibilities of *Leishmania donovani* promastigote and amastigote stages to antileishmanial reference drugs: practical relevance of stage-specific differences. **Antimicrob Agents Chemother** v. 53, n. 9, p. 3855-2859, 2009 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19546361>

VIANNA, G. Sobre uma nova espécie de *Leishmania*. **Bras. Med.** V. 25, p. 411, 1911

WERNECK, GL et al. Multilevel modelling of the incidence of visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil. **Epidemiol. Infect.** v. 135, n. 2, p. 195-201, 2007 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16824254>

WILLIAMS, RA et al. Cysteine peptidases CPA and CPB are vital for autophagy and differentiation in *Leishmania mexicana*. **Mol. Microbiol.** v. 61, n. 3, p. 655–674, 2006 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16803590>

YARDLEY, V et al. The sensitivity of clinical isolates of *Leishmania* from Peru and Nepal to Miltefosine. **Am J Trop Med Hyg** v 73, p -272-275, 2005 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16103588>

ZAULI-NASCIMENTO, RC et al. In vitro sensitivity of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Brazilian isolates to meglumine antimoniate and amphotericin B. **Tropical Medicine and International Health** v. 15, n. 1, p. 68-76, 2010 disponível em <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19874570>

APÊNDICE 1 – Artigo publicado na Revista Brasileira de Farmacognosia

Revista Brasileira de Farmacognosia 25 (2015) 7–10



Original Article

Chromenes from leaves of *Calea pinnatifida* and evaluation of their leishmanicidal activity

Tamires C. Lima^a, Alan Diego C. Santos^b, Danielle T.M. Costa^c, Rafaela J. Souza^a, Anderson Barison^b, Mário Steindel^c, Maique W. Biavatti^{a,*}

^a Departamento de Ciências Farmacêuticas, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

^b Departamento de Química, Universidade Federal do Paraná, Curitiba, PR, Brazil

^c Departamento de Microbiologia e Parasitologia, Centro de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Article history:
Received 22 October 2014
Accepted 26 January 2015
Available online 12 February 2015

Keywords:
Asteraceae
Calea pinnatifida
Chromenes
Leishmanicidal activity

ABSTRACT

Calea pinnatifida (R. Br.) Less., Asteraceae, is popularly known as “quebra-tudo”, “cipó-cruzo” or “arauca”. This species is used in the folk medicine for the treatment of stomach pain, giardiasis and amoebiasis. The aim of this study was to isolate and identify chromenes from leaves of *C. pinnatifida* and evaluate their leishmanicidal activity. A fraction from leaves of *C. pinnatifida* was analyzed for their chemical constituents, resulting in the isolation and characterization of four known chromenes: 6-acetyl-7-hydroxy-2,2-dimethylchromene (1), 6-acetyl-7-methoxy-2,2-dimethylchromene (2), 6-(1-hydroxyethyl)-7-methoxy-2,2-dimethylchromene (3) and 6-(1-ethoxyethyl)-7-methoxy-2,2-dimethylchromene (4). Structure identification of isolated compounds involved analysis of spectral data of 1D and 2D-NMR. The isolated compounds are here reported for the first time in *C. pinnatifida*, and the chromenes 1 and 3 show a moderate leishmanicidal activity.

© 2014 Sociedade Brasileira de Farmacognosia. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.

Introduction

Calea L. is a large genus of the Asteraceae family (tribe Heliantheae, subtribe Melampodiinae), containing approximately 125 species distributed essentially in tropical and subtropical zones of the Americas (Roque and Carvalho, 2011), with the greatest number of species being recorded in Brazil (Mondin and Bringel Jr., 2010). This genus has been reported in the literature to possess various biological properties, such as anti-inflammatory (Gomes and Gil, 2011), antiparasitic (Kohler et al., 2002), antileishmanial (Wu et al., 2011), acaricidal (Ribeiro et al., 2011), antifungal (Flach et al., 2002), antidiabetic (Ramos et al., 1992), antimicrobial (Do Nascimento et al., 2004), antihypertensive (Guerrero et al., 2002), and cytotoxic activities (Nakagawa et al., 2005).

Calea pinnatifida (R. Br.) Less. is popularly known as “arauca”, “cipó-cruzo” or “quebra-tudo” (Mors et al., 2000). This species is used in the folk medicine for treating digestive disorders, giardiasis and amoebiasis (Malhado Filho, 1947; Prusk and Urbatsch, 1988; Mors et al., 2000). Previous phytochemical investigations of

the petroleum ether and ethyl acetate extracts from aerial parts of this plant and its essential oil revealed the presence of fatty esters, phenolic acids, sterols, monoterpenes, one polyacetylene, and one sesquiterpene lactone (Ferreira et al., 1980a,b; Kato et al., 1994).

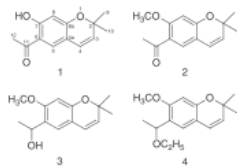
Chromenes (benzopyrans) represent a class of secondary metabolites that have generated great attention because of their interesting biological and pharmacological properties (Ribeiro et al., 2011; Thomas and Zachariah, 2013). Several studies have demonstrated the insecticidal, antibacterial, fungicidal and cytotoxic activities of these substances (Baidara et al., 1992; Burkhardt et al., 1994; Iqbal et al., 2004; Chen et al., 2005). Furthermore, some compounds of this class of natural products have been described to have notable antiprotozoal effect (Alizadeh et al., 2008; Batista Jr. et al., 2008; Harel et al., 2011).

Herein, we report the isolation and the structure determination of four known chromenes, named as 6-acetyl-7-hydroxy-2,2-dimethylchromene (1), 6-acetyl-7-methoxy-2,2-dimethylchromene (2), 6-(1-hydroxyethyl)-7-methoxy-2,2-dimethylchromene (3) and 6-(1-ethoxyethyl)-7-methoxy-2,2-dimethylchromene (4). In addition, the isolated compounds were selected for leishmanicidal assays based on previously reported activity of related structurally compounds in other trypanosomatid protozoa (Harel et al., 2011).

* Corresponding author.
E-mail: maique.biavatti@ufsc.br (M.W. Biavatti).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.bjfp.2015.01.004>

0192-695X/© 2014 Sociedade Brasileira de Farmacognosia. Published by Elsevier Editora Ltda. All rights reserved.



Materials and methods

General experimental procedures

Melting point was determined using an MQAPP-301 melting point apparatus. Optical rotation was measured in the solvent CHCl_3 on a Jasco P-2000. The ^1H and ^{13}C NMR spectra was obtained using a high resolution Bruker AVANCE-400 and Ascend 600 spectrometers, frequency of 400 and 600 MHz for ^1H , and 100 and 150 MHz for ^{13}C , respectively. NMR spectroscopic data were acquired in CDCl_3 , TMS was used as internal standard, chemical shifts (δ) were given in ppm, and coupling constants (J) in Hz. ZD NMR experiments (HSCG, HMBC) were also performed using Bruker AVANCE-400 and Ascend 600 spectrometers.

Plant material

The leaves from *Calea pinnatifida* (R. Br.) Less., Asteraceae, were collected in September 2012, at the "Costa da Lagoa", Florianópolis, Santa Catarina, Brazil. Plant identification was performed by Dr. John F. Pruski, New York Botanical Garden, and a voucher specimen (MO-2383318 number) is deposited in Missouri Botanical Garden Herbarium (MO), St. Louis, Missouri, USA.

Extraction and isolation

Fresh leaves from *C. pinnatifida* (800 g) were extracted by maceration for 15 days at room temperature (ca. 25 °C) with ethanol 92%. After evaporation of the solvent under reduced pressure, 12 g of the ethanol extract of *C. pinnatifida* were obtained. The ethanol extract was re-dissolved in H_2O and fractionated with solvents of increasing polarity. The partitioning of this extract was performed with *n*-hexane, dichloromethane and ethyl acetate, respectively, yielding *n*-hexane (4.5 g), dichloromethane (0.5 g) and ethyl acetate (1.5 g) fractions, as well as a residual aqueous fraction (5.5 g). Initially, an aliquot of the hexane fraction (2.0 g) of the extract was subjected to column chromatography with silica gel 60. Elution was carried out using a solvent gradient of *n*-hexane:acetone in increasing polarities (100:0, 98:2, 95:5, 90:10, 70:30, 50:50, 0:100, respectively), obtaining some sub-fractions rich in chromenes (sub-fraction 1: 35 mg, sub-fraction 2: 20 mg, sub-fraction 3: 15 mg). Subsequently, these sub-fractions were purified by preparative TLC (*n*-hexane:acetone 85: 15). Sub-fraction 1 afforded 8.0 mg of 1 and 4.0 mg of 4, sub-fraction 2 yielded 18.0 mg of 2, and sub-fraction 3 afforded 5.0 mg of 3.

6-Acetyl-7-hydroxy-2,2-dimethylchromene (1)

Yellow needles; mp: 78–80 °C. ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.31 (br s, 1H, H-5), 6.33 (br s, 1H, H-8), 6.28 (d, 1H, J 9.9 Hz, H-4), 5.58 (d, 1H, J 9.9 Hz, H-3), 2.54 (s, 3H, H-12), 1.44 (s, 3H, H-9), 1.44 (s, 3H, H-10); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 77.9 (C-2), 128.9 (C-3), 121.0

(C-4), 113.5 (C-4a), 128.5 (C-5), 113.8 (C-6), 165.2 (C-7), 104.5 (C-8), 160.4 (C-8a), 28.6 (C-9), 28.6 (C-10), 202.3 (C-11), 26.1 (C-12).

6-Acetyl-7-methoxy-2,2-dimethylchromene (2)

Yellow oil; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 7.54 (s, 1H, H-5), 6.38 (s, 1H, H-8), 6.30 (d, 1H, J 9.8 Hz, H-4), 5.53 (d, 1H, J 9.8 Hz, H-3), 3.88 (s, 3H, H-13), 2.56 (s, 3H, H-12), 1.44 (s, 3H, H-9), 1.44 (s, 3H, H-10); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 77.7 (C-2), 128.4 (C-3), 121.4 (C-4), 114.0 (C-4a), 129.1 (C-5), 120.8 (C-6), 161.2 (C-7), 99.7 (C-8), 158.5 (C-8a), 28.4 (C-9), 28.4 (C-10), 197.6 (C-11), 31.9 (C-12), 55.6 (C-13).

6-(1-Hydroxyethyl)-7-methoxy-2,2-dimethylchromene (3)

Green gum; $[\alpha]_D^{20} = +45.49$ (c = 0.2133 g ml^{-1} , CHCl_3); cu. 20 °C; ^1H NMR (CDCl_3 , 400 MHz): δ 6.94 (d, 1H, J 0.3 Hz, H-5), 6.37 (s, 1H, H-8), 6.27 (dd, 1H, J 9.7, 0.3 Hz, H-4), 5.47 (d, 1H, J 9.7 Hz, H-3), 5.02 (q, 1H, J 6.5 Hz, H-11), 3.82 (s, 3H, H-13), 1.48 (d, 3H, J 6.5 Hz, H-12), 1.42 (s, 3H, H-9), 1.42 (s, 3H, H-10); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 100 MHz): δ 76.5 (C-2), 127.9 (C-3), 121.9 (C-4), 113.7 (C-4a), 123.9 (C-5), 125.6 (C-6), 157.5 (C-7), 99.9 (C-8), 153.2 (C-8a), 28.2 (C-9), 28.2 (C-10), 65.8 (C-11), 22.9 (C-12), 55.6 (C-13).

6-(1-Ethoxyethyl)-7-methoxy-2,2-dimethylchromene (4)

Green oil; ^1H NMR (CDCl_3 , 600 MHz): δ 7.00 (s, 1H, H-5), 6.34 (s, 1H, H-8), 6.29 (d, 1H, J 9.7 Hz, H-4), 5.45 (d, 1H, J 9.7 Hz, H-3), 4.74 (q, 1H, J 6.4 Hz, H-11), 3.77 (s, 3H, H-13), 3.39 (dq, 1H, J 9.4, 7.0 Hz, H-1a), 3.37 (dq, 1H, J 9.4, 7.0, 1b), 1.43 (s, 3H, H-9), 1.43 (s, 3H, H-10), 1.35 (d, 3H, J 6.4 Hz, H-12), 1.18 (dd, 3H, J 7.0, 7.0 Hz, H-2); ^{13}C NMR (CDCl_3 , 150 MHz): δ 76.3 (C-2), 127.5 (C-3), 122.2 (C-4), 113.9 (C-4a), 123.9 (C-5), 124.6 (C-6), 152.6 (C-7), 99.3 (C-8), 152.8 (C-8a), 28.2 (C-9), 28.2 (C-10), 70.9 (C-11), 22.8 (C-12), 55.5 (C-13), 63.8 (C-1'), 15.5 (C-2').

Leishmaniacid screening

Human macrophage cell line THP-1 (ATCC TIB202) was grown in RPMI-1640 without phenol red (Sigma-Aldrich, CO. St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% FBS (Life Technologies, USA), 12.5 mM HEPES, penicillin (100 U/ml), streptomycin (100 $\mu\text{g}/\text{ml}$) and Glutamax (2 mM), at 37 °C in a 5% CO_2 incubator. *L. amazonensis* MHOM/BR/77/TB0016 promastigotes, expressing β -galactosidase, were grown at 26 °C in Schneider's insect medium (Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA) supplemented with 5% heat inactivated fetal bovine serum FBS and 2% of human urine.

For the leishmaniacid screening against intracellular *L. amazonensis* amastigotes, THP-1 cells (3.0×10^6 per well) were cultivated in 96 well plates in RPMI-1640 medium supplemented as described above and treated with 100 ng/ml of phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) for 72 h at 37 °C in a 5% CO_2 to allow THP-1 cells differentiation into non-dividing macrophages (Schwende et al., 1996).

Four days culture promastigotes (4.0×10^6 parasites/ml) were washed with phosphate buffered saline, pH 7.4 (PBS) an incubated in RPMI-1640 supplemented with 10% human AB $^+$ serum heat-inactivated for 1 h at 34 °C to parasite opsonization, THP-1 cells were incubated with a parasite/cell ratio of 10:1 for 3 h at 34 °C and 5% CO_2 . After this period non-adherent parasite were removed by one wash with PBS and infected cells were incubated with 180 μl of full supplemented RPMI-1640 medium for another 24 h to allow the transformation of promastigotes into intracellular amastigotes.

Compounds 1–4 were solubilized in dimethyl sulfoxide (DMSO) and serially diluted (50–0.8 $\mu\text{g}/\text{ml}^{-1}$). Infected cell layer were

treated by addition of 20 μ l of each sample, in triplicate, followed by incubation for 8 h at 34 \pm 0.5 $^{\circ}$ C. After treatment, cells were carefully washed with PBS and incubated for 16 h 37 $^{\circ}$ C with 250 μ l of chlorophenol- β -D-galactopyranoside (Sigma–Aldrich Co., St. Louis, MO, USA) (CPRG) at 100 μ M and Nonidet P-40 (Amresco Inc, Solon, Ohio, USA) (NP-40) 0.1%. Optical density was read at 570/630 nm in an Infinite M200 TECAN, Austria. Amphotericin B (Bristol-Myers, Squibb) was used as positive control and DMSO 1% as negative control.

Results and discussion

The hexane fraction of the leaves from *C. pimmarifida* was phytochemically studied by column chromatography on silica gel and the chromene-rich fractions obtained were further purified by preparative TLC to isolate compounds **1–4**. Their chemical structures were established by physical data and 1D and 2D-NMR spectroscopy, and their spectral data were in agreement with published data (Steelink and Marshall, 1979; Fang et al., 1988; Zhai et al., 2010; Harel et al., 2011).

Compounds **1–4** showed closely related NMR data. The 1D and 2D-NMR spectra data of these compounds are consistent with those of a chromene skeleton. Thus, compounds **1**, **2**, **3** and **4** were identified as 6-acetyl-7-hydroxy-2,2-dimethylchromene (eupatoriachromene) (Harel et al., 2011), 6-acetyl-7-methoxy-2,2-dimethylchromene (methyl-eupatoriachromene) (Zhai et al., 2010), 6-(1-hydroxyethyl)-7-methoxy-2,2-dimethylchromene (encecalin) (Fang et al., 1988) and 6-(1-ethoxyethyl)-7-methoxy-2,2-dimethylchromene (ethyl enecalol) (Steelink and Marshall, 1979), respectively. There are no spectroscopic or optical evidences to define the absolute stereochemistry of C-11 from compounds **3** and **4**. Optical rotation of enecalol (**3**) was determined as +45.49 (see details above).

Compound **4** (C₁₈H₂₂O₄) was isolated as a green oil. Its ¹H NMR spectrum showed the presence of two singlets at δ 7.00 (s, 1H, H-5) and δ 6.34 (s, 1H, H-8), indicating the presence of a 1,2,4,5-tetra-substituted benzene ring. These signals associated with a pair of AM doublets at δ 6.29 (d, 1H, J 9.7 Hz, H-4) and δ 5.45 (d, 1H, J 9.7 Hz, H-3), typical of a cis-olefin, suggested a benzopyran moiety that together with the presence of a singlet at δ 1.43 (s, 6H, H-9 and H-10), indicated a chromene skeleton. Furthermore, it was also possible to observe a singlet at δ 3.77 (s, 3H, H-13), typical of a methoxy group; a doublet at δ 1.35 (d, 3H, J 6.4 Hz, H-12) and a quartet at δ 4.74 (q, 1H, J 6.4 Hz, H-11), corresponding to a carbonyl hydrogen. This compound also exhibited two doublet of quartets at δ 3.39 (dq, 1H, J 9.4, 7.0 Hz, H-1a') and 3.37 (dq, 1H, J 9.4, 7.0, 1b') coupled to a doublet of doublets at δ 1.18 (dd, 3H, J 7.0, 7.0 Hz, H-2'), corresponding to an ethyl group attached to an oxygenated carbon δ C-11. This is the first report of the isolation of the ethyl enecalol in the genus *Calea*.

The ¹³C NMR assignments were aided by heteronuclear shift correlation experiments such as HSQC and HMBC. The HSQC and HMBC spectra demonstrated the presence of 16 carbon signals, including two sp² aromatic carbons (δ 99.3, 123.9), two aromatic quaternary carbons (δ 113.9, 124.6), two oxygenated aromatic quaternary carbons (δ 152.8, 157.6), two olefinic carbons (δ 122.2, 127.5), three sp³ oxygenated carbons (δ 55.5, 63.8, 70.9), one sp³ oxygenated quaternary carbons (δ 76.3) and four methyl groups (δ 15.5, 22.8, 28.2, 28.2).

Eupatoriachromene has been previously isolated from *Calea* species, such as *C. serrata* (Steinbeck et al., 1997), *C. hispida* (Bohlmann et al., 1982b), *C. oxylepis* (Bohlmann et al., 1982a), *C. rotundifolia* (Bohlmann et al., 1981a) and *C. peckii* (Castro et al., 1989). Moreover, this compound has been tested on *Trypanosoma* (Harel et al., 2013) and insect larvae (Klocke et al., 1985).

Table 1
Leishmanicidal activity of isolated compounds from *Calea pimmarifida*.

Material tested 50 μ g ml ⁻¹	% Growth inhibition (<i>L. amazonensis</i>) amastigotes
Compound 1	39.3 (\pm 7.8)
Compound 2	No activity
Compound 3	32.1 (\pm 5.7)
Compound 4	No activity
Negative control (DMSO 1%)	0
Positive control (amphotericin B 2 μ M)	86.6 (\pm 5.0)

Methyl-eupatoriachromene was earlier isolated from *C. oxylepis* (Bohlmann et al., 1982a), *C. teucrifolia* (Bohlmann et al., 1981b), *C. rotundifolia* (Bohlmann et al., 1981a) and *C. morii* (Bohlmann et al., 1981b) and tested against some protozoan parasites (Harel et al., 2013) and insect species (Klocke et al., 1985).

Enecalol was previously obtained from *C. morii* (Bohlmann et al., 1981b) and was evaluated against protozoan parasites (Harel et al., 2013), pathogenic bacteria (Kios et al., 2003), insect larvae (Klocke et al., 1985) and dermatophytes fungi (Aguilar-Guadarrama et al., 2009).

Ethyl enecalol has been described as an artifact produced during ethanol extraction of species *Encella farinosa* Gray (Steelink and Marshall, 1979). In general, ethoxylated derivatives are unlikely from the biogenetic point of view. However, this particular compound was also isolated from the *n*-hexane extract of *Ageratum conyzoides*, whose separation and purification steps did not involve any ethanol in the isolation procedure (González et al., 1991). With the aim to confirm if the compound **4** is or not an artifact produced during the extraction with ethanol, a small portion of the plant material was extracted using MeOH and subjected to the same partition procedure. A comparison performed by TLC demonstrated that the ethyl enecalol was not identified in the hexane fraction obtained from MeOH extract, therefore suggesting that this compound may be really an artifact of extraction with ethanol.

The leishmanicidal screening data of the chromenes **1–4** against the amastigote forms of *Leishmania amazonensis* are shown in Table 1. Compounds **2** and **4** did not displayed leishmanicidal activity, while **1** and **3** exhibited moderate effect against *Leishmania* intracellular amastigotes. At a concentration of 50 μ g ml⁻¹ compounds **1** and **3** inhibited the parasite intracellular growth by 39.3% and 32.3%, respectively. Amphotericin B was used as positive control, producing inhibition of 86.6% at concentration 2 μ M, and the negative control (DMSO 1%) did not show any inhibition. Comparing the structure of the four chromenes was found that the non-polar chromenes (**1** and **3**) were more bioactive than the non-polar chromenes (**2** and **4**), indicating that the polarity may play an important role in the leishmanicidal effect of these compounds.

Natural and synthetic chromenes have been reported to exhibit interesting antiprotozoal effect. A molecular docking analysis was carried out to evaluate potential *Leishmania* protein targets of antiprotozoal plant-derived chromenes and other phenolic compounds (Ogungbea et al., 2014). In this study, a chromene exhibited selective docking to *Leishmania major* N-myristoyltransferase, showing that chromenes may be promising as antiparasitic based on *in-silico* analysis. In other study, it was evaluated the leishmanicidal activity of twelve synthetic chromenes against *in vitro* *L. major* promastigotes, and some compounds exhibited important leishmanicidal effect (% growth inhibition >70%), showing the potential biological of this chemical class (Alizadeh et al., 2008).

Conclusions

The phytochemical investigation of the fresh leaves of *C. pimmarifida* afforded four known chromenes: 6-acetyl-7-hydroxy-2,2-dimethylchromene (**1**), 6-acetyl-7-methoxy-2,

2-dimethylchromene (2), 6-(1-hydroxyethyl)-7-methoxy-2,2-dimethylchromene (3) and 6-(1-ethoxyethyl)-7-methoxy-2,2-dimethylchromene (4), which are being reported in this species for the first time. Regarding the leishmanicidal activity, compounds 2 and 3 demonstrated moderate leishmanicidal effect.

Authors' contribution

TCL (PhD student) contributed in all steps of this study. DTMC and MS contributed to the biological studies. RJS contributed to isolation and purification of the compounds. AB and ADCS contributed to spectroscopic analysis. MS contributed to critical reading of the manuscript. MWB supervised the laboratory work and contributed to design of the study and critical reading of the manuscript. All the authors have read the final manuscript and approved the submission.

Conflicts of interest

The authors declare no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors are grateful to physician César Simionato for the help in the collection of the species, the Dr. John Pruski for identification of the plant, the CAFES and CNPq for financial support and the Federal University of Santa Catarina.

References

Aguilar-Guadarrama, R., Navarro, V., Leon-Rivera, I., Ros, M.V., 2009. Active compounds against *Trichoerythron* species from *Agave attenuata* var. *lanceolata*. *Nat. Prod. Res.* 23, 1559–1565.

Alizadeh, R.H., Fournumadi, A., Andrestari, S.K., Poorrajab, F., Shafiee, A., 2008. Leishmanicidal evaluation of novel synthetic chromenes. *Arch. Pharm. Chem. Life Sci.* 341, 787–793.

Bardosa, B.M.R., Hewage, C.M., Karunarathne, V., Wannigama, G.P., Adikaram, N.K.B., 1992. An antifungal chromone from *Eupatorium ripens*. *Phytochemistry* 21, 1983–1985.

Batista Jr., J.M., Lopes, A.A., Antunes, D.L., Rogasin, L.D., Kato, M.J., Balanzi, V.D.S., Ciccarelli, K.M.B., Furlan, M., 2008. Natural chromenes and chromone derivatives as potential anti-trypannosomal agents. *Bol. Pharm. Bull.* 31, 538–540.

Bohmann, F., Bajupi, M., King, R.M., Robinson, H., 1982a. Naturally occurring terpenoid derivatives. Part 421. New heliangolides *Calce oxylepis*. *Phytochemistry* 21, 1161–1169.

Bohmann, F., Gupta, R.K., Jakupovic, J., King, R.M., Robinson, H., 1982b. Furoangelangolides and farnesol derivatives from *Calce troglodyta*. *Phytochemistry* 21, 2899–2902.

Bohmann, F., Gupta, R.K., Jakupovic, J., King, R.M., Robinson, H., 1981a. Naturally occurring terpenoid derivatives. Part 138. Eudesmanolides and heliangolides from *Calce ornithogala*. *Phytochemistry* 20, 1035–1037.

Bohmann, F., Zilber, C., King, R.M., Robinson, H., 1981b. Naturally occurring terpenoid derivatives. Part 343. Heliangolides, and nerolidol and p-hydroxyacetophenone derivatives from *Calce species*. *Phytochemistry* 20, 1643–1647.

Burkhardt, C., Becker, H., Gubert, M., Thomas, J., Eicher, T., 1994. Bicyclic chromenes from *Alysicarpus peticularis*. *Phytochemistry* 37, 1593–1597.

Castro, V., Tamayo-Castillo, G., Jakupovic, J., 1989. Sesquiterpene lactones and other constituents from *Calce pinnatifida* and *pedicel*. *Phytochemistry* 28, 2415–2418.

Chen, J.J., Doh, C.Y., Chen, L.S., 1995. Cytotoxic chromenes from *Myrica formis*. *Planta Med.* 71, 379–372.

Do Nascimento, A.M., Salvador, M.J., Cardoso, R.C., Ito, L.V., de Oliveira, D.C., 2004. Antimicrobial activity of extracts and some compounds from *Calce stylifolia*. *Fitoterapia* 75, 514–515.

Fang, H., Wu, S., Mahey, T.J., 1988. Chromenes from *Agave attenuata* and related structures of two epimeric chromene dimers. *Phytochemistry* 27, 1902–1905.

Flach, A., Grogel, B., Simionato, E., da Silva, L.F., Zanatta, N., Morei, A.F., Linhares, C.E., Alves, S.S.H., 2002. Chemical analysis and antifungal activity of the essential oil of *Calce ornithogala*. *Planta Med.* 68, 836–838.

Ferreira, Z.S., Roque, N.F., Gottlieb, O.R., Oliveira, F., Gottlieb, H.R., 1980. Structural clarification of germacranolides from *Calce species*. *Phytochemistry* 19, 1481–1484.

Ferreira, Z.S., Roque, N.F., Gottlieb, O.R., Oliveira, F., 1980. Chemical study on *Calce pinnatifida*. *Chem. Abstr.* 92, 83–85.

Gomes, M., Gil, J.F., 2011. Topical anti-inflammatory activity of *Calce pinnatifida* HBK (Asteraceae) in the DPA model of mouse ear inflammation. *J. Braz. Chem. Soc.* 32, 2391–2395.

González, A.C., Aguilar, Z.E., Grillo, T.A., Luis, J.G., Rivera, A., Calle, J., 2011. Chromenes from *Agave attenuata* conpoids. *Phytochemistry* 30, 1137–1139.

Gouveia, M.F., Paulista, P., Carrón, R., Martín, M.L., Astorga, L., Rondón, L.S., 2002. Assessment of the antihypertensive and vasodilator effects of ethanollic extracts of some Colombian medicinal plants. *J. Ethnopharmacol.* 80, 17–42.

Harel, D., Khalil, S.A., Kaiser, M., Braun, R., Wünsch, B., Schmidt, T.J., 2011. Eneccolangelate, an unsaturated chromene from *Agave attenuata* L.: total synthesis and investigation of its antiproliferative activity. *J. Ethnopharmacol.* 137, 620–625.

Harel, D., Schlegelmann, D., Prinz, H., Brun, R., Schmidt, T.J., Wünsch, B., 2013. Natural product derived antiproliferative agents: synthesis, biological evaluation, and structure-activity relationships of novel chromene and chromone derivatives. *J. Med. Chem.* 56, 7442–7448.

Iqbal, M.C.M., Jayasinghe, U.L.B., Herath, H.M.T.B., Wijesekera, K.B., Fujimoto, Y., 2004. Tungstic chromone from *Agave attenuata* conpoids. *Phytochemistry* 32, 1159–1205.

Kato, E.T.M., Akitsu, M.K., Matsui, F.J.A., Cravino, A.A., Alencar, J.M., 1994. Constituents of *Calce pinnatifida*. *Fitoterapia* 65, 277.

Klocke James, A., Belandieri Mansueto, F., Manni Roberto, P., Kingsford, E., 1985. Insecticidal chromenes from the volatile oil of *Mentha piperita*. *J. Chem. Ecol.* 11, 701–712.

Köhler, I., Jenett-Siems, K., Siems, K., Hernández, M.A., Ibarra, R.A., Berendshagen, W.C., Biende, U., Eich, E., 2002. *In vitro* antiproliferative investigation of medicinal plants from El Salvador. *Z. Naturforsch. c*, 57, 277–281.

Malhado Filho, 1947. *Novo antidiarreico vegetal: Calce pinnatifida* Less. *Arg. Cir. Clin. Exp.* 31, 41.

Mondini, C.A., Bridel Jr., J.R.A., 2010. In: Forzza, R.C., et al. (Eds.), *Calce*. Available from: <http://floradivulga.org.br/2010/08/10/3751> (accessed June 2014).

Moraes, W.B., Rizzini, C.T., Pereira, N.A., 2000. Medicinal Plants of Brazil. Reference Publications, Alagoas.

Nakagawa, Y., Iinuma, M., Matsura, N., Yi, K., Naito, M., Nakayama, T., Nozawa, Y., Akao, Y., 2005. A potent agouti-inducing activity of a sesquiterpene lactone, acumbolide, in B6D.F1 cells: a crucial role of agouti-inducing factor. *J. Pharm. Sci.* 94, 242–252.

Ogunbebe, I.V., Erwin, W.R., Setzer, W.N., 2014. Antileishmanial phytochemical phenols: molecular docking to potential protein targets. *J. Mol. Graph. Model.* 48, 105–117.

Pruski, J.E., Urbaniak, L.E., 1988. Five new species of *Calce* (Compositae: Heliantheae) from Maranhão, Brazil. *Brittonia* 40, 341–356.

Ramos, R.R., Alacón-Aguilar, F., Lara-Lemos, A., Flores-Saenz, J.L., 1992. Hypoglycemic effect of plants used in Mexico as antidiabetics. *Arch. Med. Res.* 23, 59–64.

Ribeiro, V.S.S., Santos, J.C., Martins, J.R., Schrippebrand, J., Siqueira, J.R., von Poser, C.L., Apol, M.A., 2011. Analytical properties of the essential oil and preventive effect obtained from *Calce serotina* (Asteraceae) on the cattle tick *Rhipicephalus (Boophilus) microplus* (Acari: Ixodidae). *Ver. Parasitol.* 379, 195–198.

Rios, M.Y., Aguilar-guadarrama, A.B., Navarro, V., 2003. Two new benzofurans from *Eupatorium ochroleucum* and their antileishmanial activity. *Planta Med.* 69, 967–970.

Roque, N., Carvalho, V.C., 2011. Estudos taxonômicos do gênero *Calce* (Asteraceae, Neurolaenaceae) no estado da Bahia, Brasil. *Rodriguezia* 62, 547–561.

Schwobbe, H., Hübner, E., Ambis, P., Dörner, P., 1996. Differences in the state of differentiation of THP-1 cells induced by phorbol ester and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *J. Leukoc. Biol.* 59, 555–561.

Steinhilber, C., Marshall, C.F., 1979. Structures, synthesis, and chemotaxonomic significance of some new acroprenolone derivatives from *Enkelia farinosa* Gray. *J. Org. Chem.* 44, 1429–1433.

Steinhilber, C., Spitzer, V., Sarnotta, M., von Poser, G., 1997. Identification of two chromenes from *Calce serotina* by semiochemical structure elucidation. *J. Nat. Prod.* 60, 627–662.

Thomas, N., Zachariah, S.M., 2013. Pharmacological activities of chromene derivatives: an overview. *Asian J. Pharm. Clin. Res.* 6, 11–15.

Wu, H., Fronczek, F.R., Burand, J.L., C.J., Zjawiony, J.K., 2011. Antileishmanial Germacranolides from *Calce ornithogala*. *Planta Med.* 77, 749–753.

Zhai, H., Zhao, C., Yang, C., Sun, H., Yi, B., Sun, L., Chen, W., Zheng, S., 2010. A new chromene glycoside from *Tibetia diversifolia*. *Chem. Nat. Compd.* 46, 198–200.

APÊNDICE 2 – Resumo do XI Congresso Latinoamericano de Botânica



**CONGRESSO
LATINOAMERICANO DE
BOTÂNICA**

BOTÂNICA NA AMÉRICA LATINA: CONHECIMENTO, INTERAÇÃO E DIFUSÃO

LXI CONGRESSO NACIONAL DE BOTÂNICA
XXXIV EBOBT - ENCONTRO REGIONAL DE BOTÂNICOS -
MG, BA, ES 18 A 22 DE OUTUBRO DE 2014 - MARIANA - BARRA - BRASÍLIA

INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE ESPÉCIES DE ANNONACEAE DO NORTE DO ESTADO DE MATO GROSSO.

AUTOR(ES): **Rafael Laurindo Morales;** Aline Fernandes Pontes
Pires; Gabriela Lawisch; Dênia Mendes de Sousa Valladão; Bruno Antonio
Marinho Sanchez; Mario Steindel; Danielle Tocantins Moura Costa; Carla
Regina Andrichetti;

INSTITUIÇÃO:

UFMT
UFSC

Estudos químicos e farmacológicos de Annonaceae têm mostrado o acúmulo de diferentes metabólitos secundários com importantes atividades farmacológicas, tais como, citotóxica (acetogeninas), antitumoral (alcalóides) e leishmanicida (alcalóides). O objetivo deste trabalho foi realizar a investigação fitoquímica e a avaliação da atividade leishmanicida de espécies de Annonaceae coletadas em municípios do norte do estado de Mato Grosso. Para a realização deste estudo foram coletadas amostras de três espécies da família: *Duguetia* sp., *Guatteria punctata* (Aubl.) R.A. Howard e *Xylopia benthhamii* R.E.Fr.. As amostras foram herborizadas e identificadas segundo a metodologia usual utilizada na taxonomia vegetal, e as exsiccatas foram depositadas no Herbário Centro-Norte-Mato-Grossense (CNMT) da UFMT, do Campus Universitário de Sinop. Ramos e folhas das amostras coletadas foram separados, secos, moídos e submetidos à maceração com hexano e sucessivamente com acetato de etila e metanol, para serem utilizados nos estudos farmacológicos. Após a evaporação dos solventes foram obtidos os extratos hexânicos, acetato de etila e metanólicos, que foram avaliados fitoquimicamente por cromatografia de camada delgada (CCD). Estes extratos foram avaliados em relação à potencial atividade leishmanicida contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, a uma concentração de 50 µg/mL. A análise fitoquímica dos extratos dos ramos de *Duguetia* sp, revelaram a presença de flavonoides no extrato metanólico; de taninos no extrato acetato de etila e metanólico; de terpeno em todos os extratos e de alcalóides nos extratos acetato de etila e metanólico. O extrato hexânico de *G. punctata*, os extratos acetato de etila de *X. benthhamii* e de *Duguetia* sp, a uma concentração de 50 µg/mL, inibiram 26%, 30% e 44% da viabilidade das formas promastigotas de *L. amazonensis*, respectivamente. Os demais extratos não apresentaram valores significativos de inibição destes parasitos. Assim, pode-se verificar que o extrato acetato de etila dos ramos de *Duguetia* sp, que contém taninos, terpenos e alcalóides, apresentou os melhores valores de inibição. (UFMT, FAPEMAT, CNPq)

Palavras-chave: Análise fitoquímica, Annonaceae, *Leishmania*.

APÊNDICE 3 – Resumo publicado nos Anais do XXIII Seminário de Iniciação Científica da UFMT



Ciências Biológicas e da Vida

Anais do XXIII Seminário de Iniciação Científica da UFMT
 © Universidade Federal de Mato Grosso
 ISSN on-line: 2237-244X - www.ufmt.br/propeq

INVESTIGAÇÃO FITOQUÍMICA E AVALIAÇÃO DA POTENCIAL ATIVIDADE LEISHMANICIDA DAS FOLHAS E RAMOS FINOS DE *Xylopia benthamii* R. E. FR (ANNONACEAE)

Gabriela Lawisch (PIBIC/FAPEMAT)

Carla R. Andrighetti (Orientadora) - Instituto de Ciências da Saúde/UFMT/Sinop

E-mail: crandrei20@yahoo.com.br

Colaboradores: Dênia M. de Sousa Valladão - Instituto de Ciências da Saúde/UFMT/Sinop,

Aline F. Pontes Pires - Instituto de Ciências Naturais Humanas e Sociais/UFMT/Sinop, Mario

Steindel, Danielle T. M. Costa - Departamento de Microbiologia e Parasitologia/UFSC

Estudos químicos e farmacológicos de espécies vegetais da família Annonaceae têm mostrado o acúmulo de diferentes metabólitos secundários com importantes atividades farmacológicas, tais como, citotóxica (acetogeninas), antitumoral (diterpenos), bactericida (alcalóides), antifúngica (terpenos), anti-HIV (diterpenos), leishmanicida e tripanomicida (alcalóides). O objetivo deste trabalho foi realizar a investigação fitoquímica e a avaliação da potencial atividade leishmanicida das folhas e ramos finos de *Xylopia benthamii* R. E. Fr (Annonaceae). Para isto, foram coletadas amostras da espécie no município de Cláudia/MT. As exsiccatas foram depositadas no Herbário Centro-Norte-Mato Grossense da UFMT do Campus Universitário de Sinop, sob os números de tomo 6120 e 6121. As folhas e ramos finos foram coletados, secos, moídos e submetidos à extração, por maceração, com hexano, acetato de etila e metanol, sucessivamente, três vezes cada solvente, com relação droga:solvente de 1:5 (massa:volume). Os ramos finos também foram submetidos à extração com etanol a 80%. Posterior à filtração e evaporação do solvente, os extratos brutos obtidos foram analisados fitoquimicamente, através das reações químicas de caracterização e por Cromatografia de Camada Delgada (CCD). Estes extratos brutos, também, foram avaliados em relação à potencial atividade leishmanicida contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, a uma concentração de 50 µg/mL. A análise fitoquímica preliminar do extrato bruto etanólico dos ramos e/ou os ramos secos e moídos de *Xylopia benthamii* R. E. Fr, por reações químicas com desenvolvimento de coloração e/ou precipitado, revelou a presença de alcalóides, flavonoides, saponinas, taninos, terpenos e acetogeninas. A análise fitoquímica por CCD evidenciou a presença de flavonoides nos extratos brutos acetato de etila e metanólico das folhas e dos ramos finos e de terpenos nos extratos hexânico, acetato de etila e metanólico das folhas e ramos finos desta espécie. Os extratos brutos hexânico e acetato de etila de *Xylopia benthamii* R. E. Fr, a uma concentração de 50 µg/mL, inibiram 87,7% ($\pm 1,7$) e 88,5% ($\pm 3,2$) da viabilidade das formas promastigotas de *L. amazonensis*, respectivamente. Os resultados obtidos com estes extratos foram semelhantes aos obtidos com o controle positivo, anfotericina B, a uma concentração de 2 µM, que inibiu 83,4% ($\pm 4,1$) da viabilidade dos parasitos, o que indica que os extratos apresentam uma potencial atividade, *in vitro*, contra as formas promastigotas de *L. amazonensis* que deverá ser melhor investigada. Estudos para a determinação da concentração inibitória a 50% (CI₅₀) em relação aos controles negativos e da concentração citotóxica a 50% das células (CC₅₀) destes extratos, já estão em andamento. Os demais extratos brutos apresentaram baixos valores de inibição ou não inibiram estes parasitos. Os extratos brutos que apresentaram atividade contêm terpenos em sua composição. Tais observações iniciais impulsionam para a realização de outros estudos, já em curso, visando o isolamento dos terpenos e a avaliação da potencial atividade leishmanicida dos mesmos.

Palavras-chave: Fitoquímica, *Xylopia*, leishmanicida.

APÊNDICE 4 – Resumo publicado na Revista de Ciências Farmacêuticas Básica Aplicada



Revista de Ciências
Farmacêuticas
Básica e Aplicada
Journal of Basic and Applied Pharmaceutical Sciences

ISSN: 1808-4532
e-ISSN: 2179-443X
Rev. Ciênc. Farm. Básica Apl., v. 35 Supl.1, Agosto 2014

FM64. Investigação Fitoquímica e Avaliação da Potencial Atividade Leishmanicida de Espécies de Annonaceae de ocorrência no Estado de Mato Grosso

Morales RL, Valladão DMS, Pontes AF, Sanchez BAM, Steindel M, Costa DTM, Andrighetti CR

Introdução: As leishmanioses são doenças responsáveis por altas taxas de mortalidade principalmente, em países em desenvolvimento. Mesmo com amplo avanço científico e tecnológico, não houve aumento significativo de fármacos que possam ser empregados no controle dessas doenças, justificando a necessidade de pesquisa e desenvolvimento de novos ativos que sejam mais eficazes, seguros e de menor custo. Nesse contexto, os produtos naturais são fontes promissoras de potenciais agentes quimioterápicos, pois apresentam importantes atividades farmacológicas, entre elas as atividades antiprotozoárias. Dados da literatura demonstraram que diferentes espécies da família Annonaceae apresentam atividades leishmanicida. **Objetivos:** realizar a investigação fitoquímica e a avaliação da potencial atividade leishmanicida das folhas e dos ramos de espécies de Annonaceae de ocorrência no Estado de Mato Grosso. **Metodologia:** as folhas e os ramos de diferentes espécies da família Annonaceae foram coletados no município de Sinop-MT. As exsiccatas foram depositadas no Herbário Centro-Norte-Mato Grossense da UFMT do Campus Universitário de Sinop. Os materiais vegetais foram secos, moídos e submetidos à maceração com hexano e sucessivamente com acetato de etila e metanol (1:5/massa:volume, por sete dias), três vezes com cada solvente. Após a evaporação dos solventes, sob pressão reduzida a 40°C, foram obtidos os extratos brutos hexânicos, acetato de etila e metanólicos que foram avaliados fitoquimicamente por cromatografia de camada delgada (CCD). Os extratos brutos obtidos foram avaliados em relação a potencial atividade leishmanicida contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, a uma concentração de 50 µg/mL. **Resultados e discussão:** As plantas coletadas foram identificadas como *Duguetia* sp e *Fusaea longifolia* (Aubl.) Saff. A análise fitoquímica dos extratos das folhas e ramos de *Duguetia* sp, por CCD, revelaram a presença de flavonoides nos extratos metanólicos; de taninos nos extratos acetato de etila e metanólicos; de terpenos em todos os extratos dos ramos e no extrato acetato de etila das folhas e de alcaloides em todos os extratos acetato de etila e metanólicos. Nenhum extrato apresentou reação positiva para saponinas, cumarinas, acetogeninas e antraquinonas. Os extratos brutos da *Fusaea longifolia* (Aubl.) Saff. estão sendo avaliados fitoquimicamente. O extrato acetato de etila dos ramos de *Duguetia* sp e os extratos hexânico e acetato de etila dos ramos de *F. longifolia* (Aubl.) Saff, a uma concentração de 50 µg/mL, inibiram 44%, 49% e 46% da viabilidade das formas promastigotas de *L. amazonensis*, respectivamente. Os demais extratos apresentaram baixos valores de inibição ou não inibiram estes parasitos. Assim, apesar dos extratos de ramos de *Duguetia* sp. e *F. longifolia* (Aubl.) Saff apresentarem valores de inibição das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* abaixo de 50%, os mesmos estão sendo estudados, através do fracionamento biomonitorado, afim de identificar as substâncias responsáveis por estas atividades.

Palavras-chave: Análise Fitoquímica, Annonaceae, *Leishmania*.

Apoio financeiro: UFMT, FAPEMAT, CNPq.