



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO E CULTURA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO PIAUI
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
NÚCLEO DE PESQUISAS EM PLANTAS MEDICINAIS
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM FARMACOLOGIA
Campus Universitário Ministro Petrônio Portela, Bloco 12- Bairro Ininga
Cep: 64049-550- Teresina-PI-Brasil-Fone (86) 3215-5872
Email: nppmpg@ufpi.br ou nppm@ufpi.br

ÁCIDO GÁLICO E ÁCIDO ELÁGICO: TANINOS COM PROPRIEDADES
ANTILEISHMANIA E IMUNOMODULADORAS

MICHEL MUÁLEM DE MORAES ALVES

TERESINA-PI
2017

MICHEL MUÁLEM DE MORAES

ÁCIDO GÁLICO E ÁCIDO ELÁGICO: TANINOS COM PROPRIEDADES
ANTILEISHMANIA E IMUNOMODULADORAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Farmacologia do Centro de Ciências da Saúde/Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí, como requisito final para obtenção do título de MESTRE EM FARMACOLOGIA.

ORIENTADOR: Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho

TERESINA-PI
2017

MICHEL MUÁLEM DE MORAES ALVES

ÁCIDO GÁLICO E ÁCIDO ELÁGICO: TANINOS COM PROPRIEDADES
ANTILEISHMANIA E IMUNOMODULADORAS

Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-graduação em Farmacologia do
Centro de Ciências da Saúde/Núcleo de Pesquisas
em Plantas Medicinais da Universidade Federal do
Piauí, como requisito final para obtenção do título
de MESTRE EM FARMACOLOGIA.

BANCA EXAMINADORA



Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho

Orientador

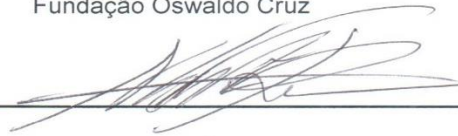
Universidade Federal do Piauí



Profa. Dra. Clarissa Romero Teixeira

Membro Externo ao Programa

Fundação Oswaldo Cruz



Profa. Dra. Márcia dos Santos Rizzo

Membro Externo ao Programa

Universidade Federal do Piauí

Universidade Federal do Piauí
Serviço de Processamento Técnico
Biblioteca Setorial do Centro de Ciências da Saúde

A474a Alves, Michel Muálem de Moraes.
Ácido gálico e ácido elágico : taninos com propriedades antileishmania e imunomoduladoras / Michel Muálem de Moraes Alves. -- Teresina, 2017.
64 f. : il.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do Piauí, Pós-Graduação em Farmacologia, 2017.
"Orientador: Prof. Dr. Fernando Aécio de Amorim Carvalho."
Bibliografia

1. Produtos naturais. 2. Ácido gálico. 3. Ácido elágico. I. Título. II. Teresina -- Universidade Federal do Piauí.

CDD 615.53

Dedico este trabalho a todos aqueles que sonham, perseveram e perseguem seus objetivos, sem desistir, sem retroceder. Aos incansáveis que almejam voar como águias.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me amar primeiro, pelo zelo e cuidado, por suas infinitas promessas.

À minha amada esposa Gabriela Muálem, por ser meu catalizador me impulsionando cada vez mais alto, onde os meus sonhos se tornam realidade, obrigado pela sua compreensão incondicional.

Aos meus amados pais Gilvan Barbosa e Nadja Muálem, por seus ensinamentos de insistência e perseverança, por toda educação e amor. A toda minha família, em especial minha querida vovozinha Dona Benedita Muálem e meus sogros Gilberto Silveira e Liane Tajra.

À Universidade Federal do Piauí e Ao Núcleo de Pesquisas em Plantas medicinais, pela oportunidade de qualificação.

Ao meu querido Professor Orientador e amigo Fernando Carvalho, por me acolher de muito bom grado no grupo, por todos os ensinamentos inspiradores e motivacionais, pelo exemplo a ser seguido de profissional competente e íntegro. A você meu professor meu respeito e admiração. À querida professora Sabrina Carneiro, pelo direcionamento acertivo na condução de um protocolo essencial deste trabalho.

As professoras Ivete Mendonça e Mariana Chaves, pelo carinho e colaboração.

Aos meus grandes amigos professores Daniel Arcanjo e Juan Gonçalves pela colaboração.

À todo o corpo docente do Programa de Pós-Graduação em Farmacologia do NPPM, por todo conhecimento adquirido ao longo dessa qualificação.

Aos meus queridos amigos, companheiros de jugo: Lucas Brito, Adriana Cunha, Thaynara Carvalho, Enoque Sobrinho, Layane Amorim, Bárbara Queiroz, Jessica Figueiredo, Kayo Alves.

Ao meu amigo desde a graduação Joilson Ferreira, pela colaboração neste trabalho juntamente com os professores Vladimir e Carlos Nery Costa.

Ao Seu Carlos, Dona Kaline e Dona Rolsilda por toda dedicação aos animais do Biotério.

Deixo também meus sinceros agradecimentos à minha turma de mestrado 2015-2017 pela amizade que levarei sempre comigo.

Agradeço a todos que sonham junto comigo e que torcem e me motivam com alegria a seguir e abraçar essa carreira que escolhi.

Lutem e lutem novamente, até cordeiros virarem leões.

Robin wood

RESUMO

ALVES, Michel Muálem de Moraes. Ácido gálico e ácido elágico: taninos com propriedades antileishmania e imunomoduladoras, 2017. 64p. Dissertação de mestrado Universidade Federal do Piauí

As leishmanioses são protozooses parasitárias causadas por mais de vinte espécies diferentes de parasitas do gênero *Leishmania*. Amplamente distribuída, a doença atinge cerca de 88 países, onde 2 milhões de pessoas estão infectadas atualmente e 1 a 2 milhões de novos casos surgem a cada ano. O parasita é digenético e apresenta duas morfologias distintas: uma forma flagelada, a promastigota, encontrada no inseto vetor e uma forma aflagelada, a amastigota, que alberga e se multiplica no interior hostil de células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado. Os tratamentos convencionais são onerosos, além de apresentarem uma gama de efeitos colaterais e já possuem casos reportados de resistência a estes. O ácido gálico (AcG) e ácido elágico (AcE) são compostos fenólicos derivados do metabolismo secundário de plantas que possuem atividades anti-inflamatórias, gastoprotetoras e anticarcinogênicas já conhecidas. Ainda não existindo relatos da exploração da sua atividade sobre leishmania. O objetivo deste trabalho foi de avaliar a atividade antileishmania, citotóxica e imunomoduladora do AcG e AcE., para tanto, foram realizados protocolos de atividade antileishmania sobre formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. major*, citotoxicidade sobre macrófagos murinos e eritrócitos e atividade imunomoduladora. Nossos resultados mostraram que o AcG e AcE foram capazes de inibir 100% do crescimento de formas promastigotas, de *L. major* na concentração de 800 µg/mL, além de provocarem alterações morfológicas nos parasitos sem, necessariamente, terem atuado degradando o DNA. Também foram capazes de induzir a morte das formas amastigotas, resultando em valores de CI₅₀ de 16,408 µg/mL para AcG e 9,812 µg/mL para AcE sobre formas promastigotas e 29,527 µg/mL para AcG e 6,798 µg/mL para AcE sobre formas amastigotas. As concentrações médias de citotoxicidade sobre macrófagos murinos foram de 126,556 µg/mL para AcG e 23,811 µg/mL para AcE. O AcG e AcE também reduziram significativamente a infecção e infectividade de macrófagos parasitados por *L. major*, bem como apresentaram elevada atividade imunomoduladora atuando sobre parâmetros de ativação de macrófagos, evidenciado pelo aumento de sua capacidade fagocítica, de seu volume lisossomal, pela indução da síntese de óxido nítrico e pelo aumento da quantidade de cálcio intracelular. Investigações futuras serão feitas para avaliar os efeitos terapêuticos do AcG e AcE em modelos experimentais.

Palavras-chave: Produtos naturais, ácido gálico, ácido elágico, *Leishmania major*, citotoxicidade em células de mamíferos, imunomodulação.

ABSTRACT

ALVES, Michel Muálem de Moraes. Gallic acid and ellagic acid: tannins with antileishmanial and immunomodulatory properties, 2017. 64p. Master's Dissertation Federal University of Piauí.

Leishmaniasis are parasitic protozoa caused by more than twenty different species of leishmania. Widely distributed, the disease reaches about 88 countries, where 2 million people are currently infected and 1 to 2 million new cases emerge each year. The parasite is digenetic and has two distinct morphologies: a flagellate form, promastigote, found in the insect vector and an aflagellate form, amastigote, which lodges and multiplies inside in the hostile cells of the mononuclear phagocytic system of the vertebrate host. Conventional treatments are costly in addition to presenting a range of side effects and already have reported cases of resistance to them. Gallic acid (GA) and ellagic acid (EA) are phenolic compounds derived from the secondary metabolism of plants that have known anti-inflammatory, protective and anticarcinogenic activities. There are no reports of the exploitation of antileishmania activity. The objective of this work was to evaluate the antileishmania, cytotoxic and immunomodulatory activity of GA and EA, For this, protocols of antileishmania activity on promastigotes and axenic amastigotes of *L. major*, cytotoxicity on murine macrophages and erythrocytes and immunomodulatory activity. They results showed that GA and EA were able to inhibit 100% growth of promastigotes, *Leishmania major* in the concentration of 800 µg/mL, besides causing morphological alterations without activity on DNA degradation of the parasites, as well as inducing death of amastigote forms at the same concentrations. IC₅₀ values of 16,408 µg/mL for GA and 9,812 µg/mL for EA on the promastigote forms and 29,527 µg/mL for GA and 6,798 µg/mL for EA on amastigote forms. Mean concentrations of cytotoxicity on murine macrophages were 126.556 µg/mL for GA and 23.811 µg/mL for EA. GA and EA were also able to significantly reduce infection and infectivity of macrophages parasitized by *L. major* as well as showed high immunomodulatory activity acting on macrophage activation parameters increasing their phagocytic capacity, their lysosomal volume, inducing the synthesis of nitric oxide and increasing the amount of intracellular calcium. Future investigations will be made to evaluate the therapeutic effects of GA and EA in experimental models.

Key words: Natural products, gallic acid, ellagic acid, *Leishmania major*, Cytotoxicity in mammalian cells, immunomodulation.

LISTA DE FIGURAS, QUADRO E TABELA

Figura 1	Distribuição geográfica da Leishmaniose Tegumentar Americana.	16
Figura 2	Formas digenéticas da <i>Leishmania</i> spp.	17
Figura 3	Ciclo de vida de parasitos do Gênero <i>Leishmania</i> .	19
Figura 4	Estruturas químicas de fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses	22
Figura 5	Estruturas moleculares do ácido gálico (A) e do ácido elágico (B).	29
Figura 6	Atividade antileishmania do AcG e AcE sobre formas promastigotas (A) e amastigotas axênicas (B)	38
Figura 7	Formas promastigotas de <i>L. major</i> coradas com panótico rápido®	38
Figura 8	Gel de agarose submetido a eletroforese a 100 V durante 2 h	39
Figura 9	Efeitos citotóxicos de AcG e AcE contra macrófagos peritoneais murinos (A) e eritrócitos de carneiro (B).	40
Figura 10	Macrófagos experimentalmente infectados por <i>L. major</i>	41
Figura 11	Efeitos de AcG, AcE e anfotericina B como droga de referência, para avaliar a infecção (A) e infectividade (B) no tratamento de macrófagos murinos infectados por <i>L. major</i> .	42
Figura 12	A influência de AcG e AcE sobre o volume lisossomal (A) e atividade fagocítica (B).	43
Figura 13	Produção de óxido nítrico de macrófagos peritoneais murinos tratados com AcG (A) e AcE (B) por 24 h na presença (+) ou ausência (-) de formas promastigotas de <i>L. major</i> .	44
Figura 14	Quantificação de cálcio citoplasmático em macrófagos tratados por 48 h com Veiculo (DMSO 60 µg/mL), Anf B, AcG e AcE, na ausência (-) ou presença (+) de formas amastigotas de <i>L. major</i> internalizadas.	45
Quadro 1	Forma de apresentação da doença e espécies relacionadas	18
Tabela 1	Atividade antileishmania, efeitos citotóxicos sobre células de mamíferos e valores de Índice de Seletividade (IS) calculados para AcG e AcE.	40

ABREVIATURAS E SIGLAS

AcG	Ácido gálico
AcE	Ácido elágico
Anf B	Anfotericina B
APC	Célula apresentadora de antígeno
ANOVA	Análise de variância
BOD	Demanda bioquímica de oxigênio
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CC₅₀	Concentração citotóxica média
CEEA	Comitê de Ética em Experimentação Animal
CH₅₀	Concentração hemolítica média
CI₅₀	Concentração inibitória média
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
IFN-γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina-10
IL-12	Interleucina-12
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
LCD	Leishmaniose cutânea difusa
LCL	Leishmaniose cutânea localizada.
LD	Leishmaniose cutânea disseminada
LDPC	Leishmaniose dérmica pós calazar
LMC	Leishmaniose mucocutânea
LPS	Lipopolissacarideo
LT	Leishmaniose tegumentar
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose Visceral
MHC	Complexo de histocompatibilidade
MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazolium brometo
NO	Óxido nítrico
NPPM	Nucleo de Pesquisas em plantas Medicinais.
PBS	“Phosphate buffered saline”- Salina tamponada com fosfato
PKC	Proteína quinase C
PKζ	Proteína quinase zeta.

PMCA4	Plasma membrane Ca^{2+} ATPase
SERCA 3	Sarcoplasmic/endoplasmic reticulum calcium ATPase 3
SFB	Soro fetal bovino
SPSS	Statistical Package for the Social Sciences
SUS	Sistema Único de Saúde
Th1	Linfócito T auxiliar 1
Th2	Linfócito T auxiliar 2
TNFα	“Tumor necrosis factors” - Fator de necrose tumoral alfa
UFPI	Universidade Federal do Piauí
WHO/OMS	“World Health Organization” - Organização Mundial de Saúde

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
2.1 Leishmanioses	15
2.1.1 Epidemiologia	15
2.1.2 Agente Etiológico	17
2.1.3 Ciclo biológico	18
2.1.4 Resposta imune à infecção por leishmania	20
2.1.5 Tratamento das leishmanioses	21
2.2 Plantas medicinais e produtos naturais: fonte potencial para terapêutica.	24
2.2.1 Taninos.	26
3 OBJETIVOS:	28
3.1 Objetivo Geral:	28
3.2 Objetivos Específicos:	28
4 METODOLOGIA	29
4.1 Substâncias utilizadas	29
4.2 Parasitas e células	30
4.3 Atividade antileishmania do AcG e do AcE sobre formas promastigotas e amastigotas axênicas de <i>L. major</i> .	30
4.4 Micrografias da atividade antileishmania sobre formas promastigotas	31
4.5 Avaliação da integridade de DNA de <i>L. major</i> após tratamento com AcG e AcE.	31
4. 6 Determinação da citotoxicidade	32
4. 6. 1 Citotoxicidade sobre macrófagos e Índice de Seletividade (IS).	32
4. 6. 2 Citotoxicidade sobre eritrócitos de carneiro.	32
4. 7 Atividade do AcG e AcE sobre macrófagos infectados por <i>L.major</i>	33

4.8 Avaliação de parâmetros de ativação de macrófagos.	33
4. 8. 1 Preparo de soluções	33
4. 8. 2 Avaliação da atividade lisossomal	34
4. 8. 3 Determinação da capacidade fagocítica	34
4. 8. 4 Avaliação da indução da síntese de óxido nítrico	34
4. 8. 5 Quantificação de cálcio citoplasmático	35
4. 9 Análise estatística	36
5 RESULTADOS	37
5.1 Ensaio de atividade antileishmania	37
5.2 Determinação da citotoxicidade	39
5.3 Efeitos sobre a infecção e a infectividade de macrófagos	40
5.4 Atividade lisossomal e determinação da Capacidade fagocítica	43
5.5 Quantificação da produção de óxido nítrico (NO)	44
5.6 Quantificação de cálcio citoplasmático	45
6 DISCUSSÃO	46
7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	52
9 REFERÊNCIAS	53

1 INTRODUÇÃO

Infecções por protozoários são um problema de saúde pública mundial, especialmente em países subdesenvolvidos, onde aproximadamente 14% da população estão sob o risco de serem infectadas (KONDRASHIN et al., 2011; WALDRON et al., 2011). Nesse contexto, as leishmanioses, protozooses causadas por mais de 20 espécies do gênero *Leishmania*, são consideradas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) como uma das seis principais doenças infecciosas com alta incidência e capacidade de produzir deformidades, afetando mais de 12 milhões de pessoas, sendo 2 a 3 milhões de novos casos notificados em todo o mundo (MITROPOULOS; KONIDAS; DURKIN-KONIDAS, 2010). Dentre as formas de manifestações clínicas dessa doença (cutânea, mucocutânea e visceral), a forma cutânea é a mais disseminada e é responsável por causar deformidades físicas nos pacientes, sendo a *Leishmania major* a espécie responsável pelo maior número de casos dessa manifestação (COLEMAN, 2007; REITHINGER et al., 2007; ; MITROPOULOS et al., 2010; KAYE; SCOTT, 2011). Amplamente distribuída, a doença atinge o Oriente Médio, África e parte das Américas. A infecção se dá através do repasto sanguíneo das fêmeas de flebotomíneos, que vivem em áreas florestais, cavernas, tocas de roedores e também em área peridomiciliar (REITHINGER; COLEMAN, 2007; REITHINGER et al., 2007).

O parasita é digenético e apresenta duas morfologias distintas: uma forma flagelada, a promastigota, infectante e presente no inseto vetor e outra forma não flagelada, a amastigota, que está presente no hospedeiro vertebrado. Neste, o parasita alberga e se multiplica no interior hostil de células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado, atuando através de mecanismos evasivos de imunossilenciamento, tais como: redução da síntese de iNOS (Óxido Nítrico Sintase induzida) e tendenciando o sistema imune a desencadear uma resposta do tipo Th2, induzindo a célula a expressar citocinas anti-inflamatórias (IL4, IL10, por exemplo) que resultam em aumento da carga parasitária. Por outro lado, quando há ocorrência de resposta imune do tipo Th1 (alta expressão de INF- γ e TNF- α) esta, por sua vez, confere cura ou proteção. (MONTALVO et al., 2012; ISLAMUDDIN et al., 2015). Roy et al., 2014 ainda descrevem um novo mecanismo exasivo do qual o parasita utiliza, diretamente relacionado ao cálcio intracelular, quando este está presente ocorre a ativação da PKC clássica que é responsável pela sinalização de INF- γ e TNF- α para

ativar resposta Th1. A presença do parasita nas células hospedeiras favorecem a diminuição de cálcio intracelular, uma vez isto ocorrendo outra via de sinalização é ativada, sendo esta a via atípica da PKC- ζ , sendo responsável pela sinalização de IL4 e IL10 para ativar a resposta Th2.

Os tratamentos convencionais para as leishmanioses são onerosos, limitados, pouco seguros e possuem uma gama de efeitos colaterais, além de contribuírem para a resistência do parasita o que retarda o tratamento. A anfotericina B por exemplo, é utilizada mundialmente como principal fármaco no tratamento da doença, porém possui grandes efeitos colaterais, como cardiotoxicidade e nefrotoxicidade, além de seu elevado custo. (ASHFORD, 2000; ALIZADEH et al., 2008).

Produtos naturais derivados de plantas têm sido promissores na atividade antileishmania. Além de demonstrarem potencial citotóxico sobre o parasita, são capazes de agir em sinergismo com o sistema imune do hospedeiro através da ativação de macrófagos. (ISLAMUDDIN et al., 2015; RODRIGUES et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2017). Neste contexto os taninos são classificados como polifenóis derivadas do metabolismo secundário das plantas, solúveis em água, quimicamente reativos e inter e intra-moleculares por pontes de hidrogênio, sendo a maior parte derivada do metabolismo da glicose por diferentes reações bioquímicas, que consistem na via do ácido chiquímico ou do acetato (DE JESUS et al., 2012)

Dentre alguns compostos fenólicos importantes encontram-se o ácidos gálico e seus dímeros (ácido digálico ou hexaidroxidifênico e ácido elágico), sendo caracterizados como lactonas fenólicas de ocorrência natural encontradas em algumas plantas, dentre elas: *Anacardium occidentale* L., *Myracrodruon urundeuva* Allemão, *Anogeissus leiocarpus* (DC.) Guill. & Perr., *Quercus infectoria* Olivier, *Stryphnodendron obovatum* Benth., por exemplo, na forma de taninos hidrolisáveis chamados elagitaninos. (RIBEIRO et al., 2015; KHEIRANDISH et al., 2016; MURAKAMI et al., 1991; VATTEM; GHAEDIAN; SHETTY, 2005; SHUAIBU et al., 2008).

A falta de uma vacina segura e eficaz juntamente com os dissabores existentes nos tratamentos convencionais, vêm despertando para a busca por novos fármacos que visam não apenas obter efeitos sobre o parasita em si, como também a capacidade de agir em sinergismo com a resposta imune do hospedeiro através de sua modulação (ISLAMUDDIN et al., 2015). Nesse contexto o presente trabalho tem

como objetivo explorar o potencial antileishmania, citotóxico e imunomodulador do ácido gálico e do ácido elágico.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Leishmanioses

2.1.1 Epidemiologia

Atualmente cerca de um bilhão de pessoas são afetadas por doenças conhecidas como “enfermidades negligenciadas” ou “doenças tropicais negligenciadas” (DTN). Epidemiologicamente, estas doenças não apresentam predisposição por sexo, gênero ou idade, contudo afeta principalmente a população de países menos desenvolvidos, localizados na Ásia, África, América do Sul e Central e em menor proporção, a de países europeus e da América do Norte. Dentre estas doenças estão incluídas a leishmaniose, doença de Chagas, malária, tuberculose, tripanossomíase africana, esquistossomose, dengue, hanseníase, filariose, cisticercose e outras (RATHI et al., 2003; WHO, 2010).

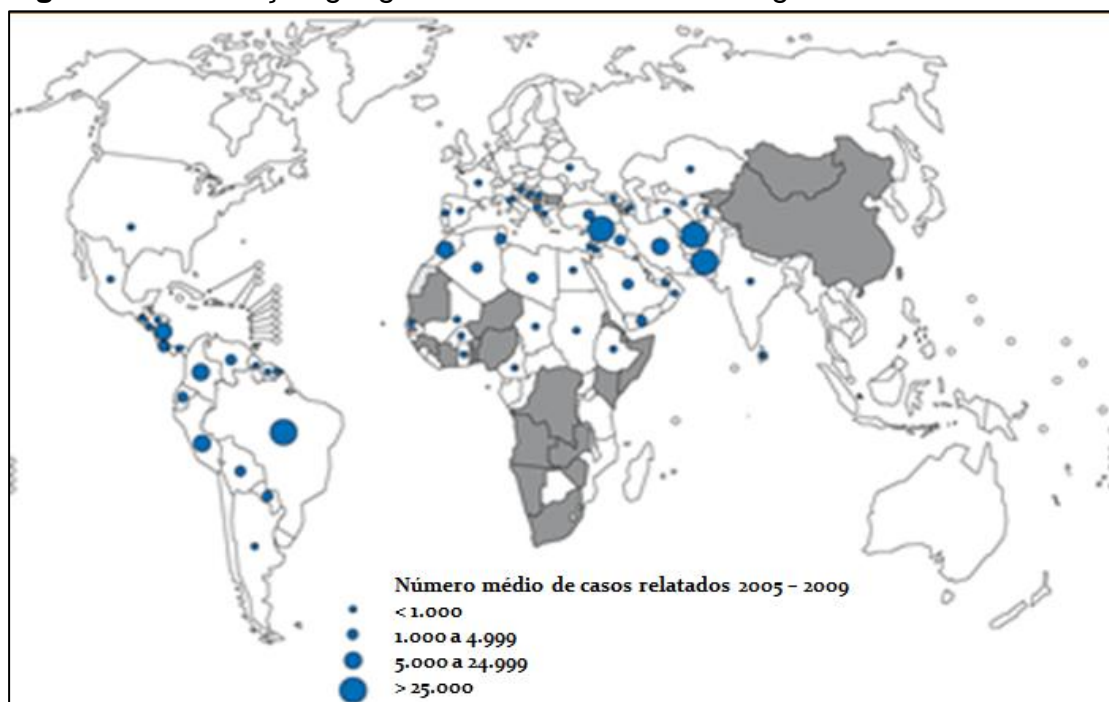
Essas doenças afetam populações pobres, que geralmente estão submetidas a condições precárias ou até mesmo ausentes de higiene, algumas destas podem ocasionar danos permanentes, levando a um alto grau de morbidade e incapacidade física e, no caso da leishmaniose, pode culminar até mesmo na desfiguração (WHO, 2010; MAIA, 2013).

A leishmaniose é uma miscelânea de doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Os hospedeiros são infectados durante o repasto sanguíneo das fêmeas do inseto vetor (dípteros - flebotomíneos), que vivem em áreas de florestas, cavernas, em tocas de roedores, ambiente domiciliar e/ou peridomiciliar (SINGH; SIVAKUMAR, 2003). Estas doenças afetam mais de 12 milhões de pessoas em todo o mundo, com 2 a 3 milhões de novos casos a cada ano (WHO 2010). Segundo a Organização Mundial da Saúde, aproximadamente 350 milhões de pessoas estão em áreas de transmissão de leishmaniose. Sendo que aproximadamente 90% dos casos diagnosticados da forma visceral localizam-se, na Etiópia, Bangladesh, Brasil, Nepal e Sudão. Já para a forma tegumentar (LT), é a mais comumente encontrada (Fig. 1), 90% dos casos ocorrem no Brasil, Afeganistão, Argélia, Irã, Peru, Arábia Saudita, Sudão, Síria, Peru e Bolívia (DNDI, 2011). São consideradas primariamente como uma zoonose podendo acometer o homem,

quando este entra em contato com o ciclo de transmissão do parasito, transformando-se em uma antropozoonose.

Atualmente, encontra-se entre as seis endemias prioritárias no mundo (WHO, 2010). No Brasil a leishmaniose é uma doença de caráter endêmico, apresentando maior incidência, da leishmaniose tegumentar americana (LTA), sendo que os casos ocorrem em todas as regiões do país, apresentando maior incidência na região Sul.

Figura 1. Distribuição geográfica da Leishmaniose Tegumentar.



Fonte: Adaptado de WHO, 2010.

Subordinando-se a causalidade das espécies, a infecção pode se manifestar como Leishmaniose Visceral Americana (LVA). Podendo a LTA ainda ser dividida em Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), Leishmaniose Cutânea Disseminada (LD), Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD) e Leishmaniose Mucocutânea (LMC) (CHOI; LERNER, 2001; LINDOSO et al., 2014). Ao atentar-se para a LTA, devido a sua magnitude, é uma afecção dermatológica que pode envolver fatores psicológicos, que se refletem no âmbito social e econômico devido a elevada ocorrência de deformidades (LINDOSO et al., 2014).

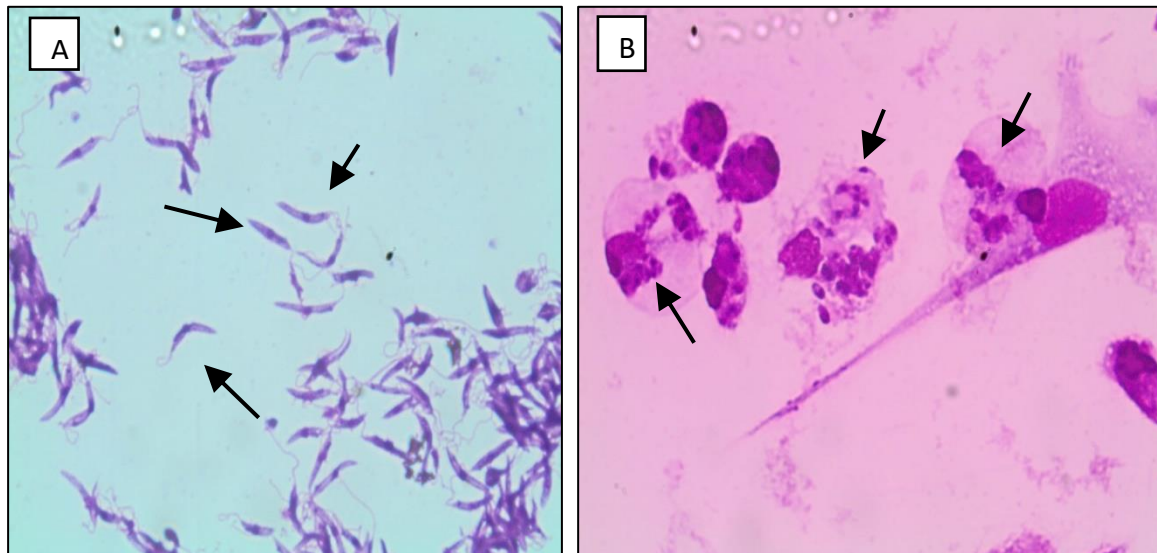
Amplamente distribuída, com registro de casos em todas as regiões brasileiras a partir da década de 80, observou-se aumento no número de casos registrados, variando de 3.000 (1980) a 35.748 (1995). Na década de 80, a LTA foi assinalada em

19 estados, verificando sua expansão geográfica quando, em 2003, foi confirmada a autoctonia em todos os estados brasileiros. Observa-se ampla dispersão e, em algumas áreas apresenta intensa concentração de casos, enquanto em outras os casos apresentam-se isolados (BRASIL, 2010).

2.1.2 Agente Etiológico

Os agentes etiológicos das leishmanioses são protozoários que pertencem ao sub-reino Protozoa, filo Sarcomastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*. (BADARÓ; SCHOOLEY, 2008). São parasitas intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear, com uma forma aflagelada ou amastigota (Fig. 2B), encontrada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados e outra flagelada ou promastigota encontrada no tubo digestivo do inseto vetor (Fig. 2A) (WHO, 2010). A forma de apresentação da doença está relacionada à espécie causadora da infecção, representadas no quadro 1.

Figura 2. Formas digenéticas da *Leishmania major*.



A) Formas promastigotas obtidas através de cultivo celular em meio Schneider's, coradas com panótico rápido®. B) Formas amastigotas internalizadas em macrófagos murinos. Aumento 1000x.

Quadro 1. Forma de apresentação da doença e espécies relacionadas

Apresentação da Doença	Espécies
Leishmaniose visceral	<i>L. (L.) donovani, L. (L.) infantum e L.(V.) chagasi</i>
Leishmaniose cutânea	<i>L. (L.) major, L. (L.) tropica e L. (L.) aethiopica, L. (L.) infantum, L. (L.) mexicana, L. (L.) pifanoi e L. (L.) amazonensis, L. (V.) braziliensis, L.(V.) guayanensis, L. (V.) panamensis e L. (V.) peruviana</i>
Leishmaniose cutânea difusa	<i>L. (L.) aethiopica, L. (L.) mexicana, L. (L.) amazonensis</i>
Leishmaniose mucocutânea	<i>L.(V.) braziliensis e L. (V) panamensis</i>
Leishmaniose cutânea disseminada	<i>L. (V). braziliensis e L. (V) amazonensis</i>

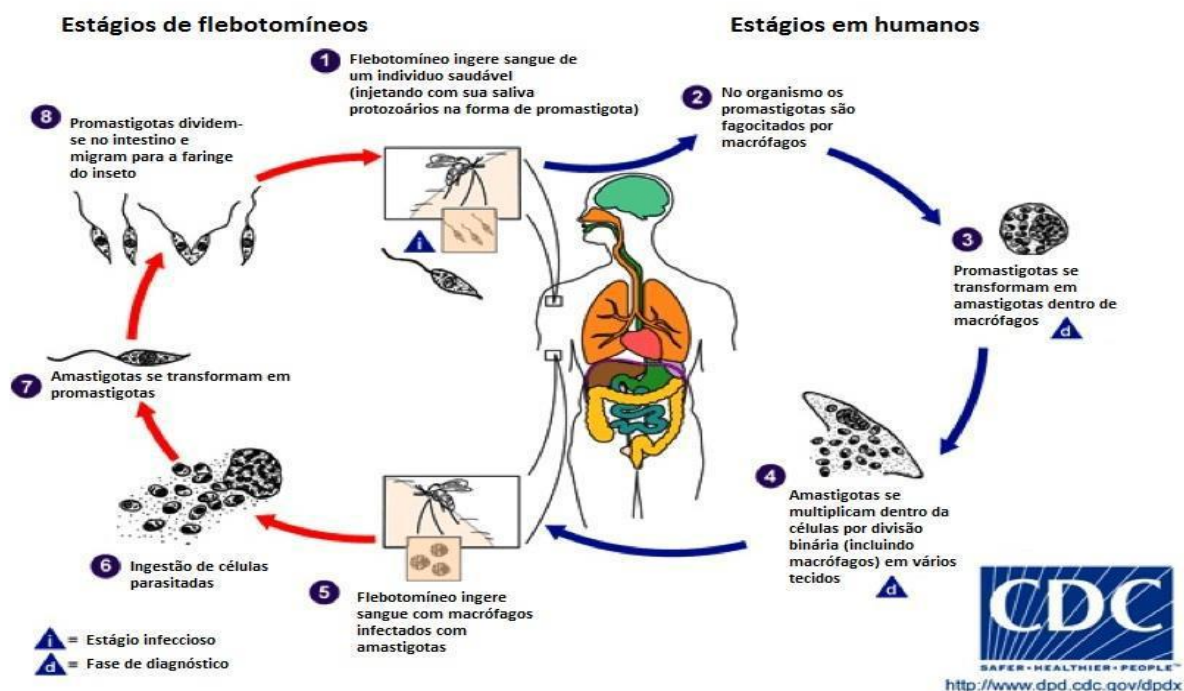
Fonte: Modificado de Kaye; Scott, 2011.

Leishmania major, a espécie utilizada neste estudo, é a mais difundida, sendo a principal espécie causadora de LTA responsável por causar deformidades em seus hospedeiros (AGGARWAL; SHISHODIA, 2006; REITHINGER; COLEMAN, 2007; REITHINGER et al., 2007; KAYE; SCOTT, 2011; MITROPOULOS et al., 2010).

2.1.3 Ciclo biológico

A infecção do inseto se dará com a ingestão de células infectadas durante o repasto sanguíneo, onde estas serão digeridas no intestino médio, e o parasita se transformam em promastigotas não infectivas (procíclicas). Em seguida o parasita passa por um processo de metacíclogênese, em que ocorrem alterações na expressão gênica que as levam a tornarem-se infectivas. Paralelo a esse processo essas formas migram para o trato digestivo anterior do inseto e assim ao se alimentar regurgitam os parasitas e dão continuidade ao ciclo (Fig. 3) (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999; KAYE; SCOTT, 2011)

Figura 3. Ciclo de vida de parasitos do Gênero *Leishmania*.



1) Flebotomíneos regurgitam formas promastigotas metacíclicas durante o repasto sanguíneo; 2) As promastigotas ao penetrarem na pele são fagocitadas por macrófagos e outros tipos de células fagocíticas mononucleares. 3) Promastigotas transformam-se em amastigotas. 4) Os amastigotas se multiplicam por divisão binária simples e prosseguem para infectar outras células. 5) A infecção torna-se sintomática e como resultado ocorre o aparecimento de lesões cutâneas ou forma visceral. 6) Os flebotomíneos se infectam pela ingestão de células infectadas durante o repasto sanguíneo. 7) No inseto, as amastigotas se transformam em promastigotas, e se desenvolvem no intestino. 8) Multiplicam-se e migram para o intestino anterior. Fonte: Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention, 2013.

As promastigotas são então fagocitadas por células do sistema monocítico fagocitário, em especial macrófagos (PATIL et al., 2010). No convívio intracelular os parasitas ficam limitados ao fagossomo, que seguidamente se funde ao lisossomo, formando o fagolisossomo, neste sofrem alterações morfológicas e bioquímicas radicais, transformando-se em amastigotas, e assim se adaptam às novas condições (ROSYPAL; ZAJAC; LINDSAY, 2003)

As leishmanias resistem à ação do fagolisossomo e se multiplicam por divisão binária até que ocupem todo o citoplasma. A rápida multiplicação faz com que ocorra a lise das células, e assim esses parasitas livres alcançam outras células (FLORES ECHEVERRÍA, 2013).

2.1.4 Resposta imune à infecção por leishmania

O sistema imune atua numa rede de cooperação, envolvendo a participação de muitos componentes estruturais, moleculares e celulares. Nesse cenário encontra-se o delicado equilíbrio entre a saúde e a doença, em que tanto a deficiência quanto o exagero resultam em dano tecidual. A resposta imune consiste em uma série de ações celulares e humorais orquestradas. Isso quer dizer que a resposta imune necessita de operações coordenadas entre a imunidade inata (neutrófilos, macrófagos e células dendríticas) e adaptativas (células T) (ROSTAMI, et al., 2010; MACHADO et al., 2012);

A dicotomia existente entre resposta imune Th1/Th2 nas infecções por leishmania, permite parasitemia ou debelação da doença (ISLAMUDDIN et al., 2015). Neste caso, uma resposta imune celular do tipo Th2 é indesejada, porque aumenta a susceptibilidade às infecções e permite a multiplicação e disseminação do parasito. No que diz respeito a resposta Th1, esta por sua vez, confere cura ou proteção, como por exemplo: Aumento de capacidade fagocítica, do volume lisossomal, da síntese de óxido nítrico e do cálcio intracelular, através de mecanismos de ativação de macrófagos (ROY et al., 2014; ISLAMUDDIN et al., 2015). Após infecção, nos indivíduos que não têm a capacidade de produzir IFN- γ e ativar macrófagos, a leishmania dissemina-se. Nesses pacientes é fácil entender o desenvolvimento da doença, pela deficiência de IFN- γ e TNF- α e alta produção de IL-4, IL-5, IL-13. Após infecção, nos indivíduos que não têm a capacidade de produzir IFN- γ e ativar macrófagos, a leishmania dissemina-se. Nesses pacientes é fácil entender o desenvolvimento da doença, pela deficiência de IFN- γ e alta produção de IL-10. A restauração da resposta imune *in vitro* na leishmaniose visceral pode ser observada pela neutralização de IL-10 ou pela adição de IL-12 às culturas de células mononucleares de sangue periférico (CMPS) PIRES et al., 2012).

A habilidade do parasita em invadir e se replicar no interior de macrófagos tem sido alvo de vários estudos científicos (CLARK et al., 2006). O patógeno ao penetrar no organismo entra em contato imediatamente com os componentes do soro, ocorrendo uma ligação com moléculas do sistema complemento e ativação das vias clássicas e alternativas, contudo os parasitos desenvolveram uma variedade de mecanismos para lidar com o estresse oxidativo, dentre eles a produção de enzimas

triptano e arginase e a inibição da atividade proteínicas quinases C (PKC), através do aumento da expressão de SERCA 3 e PMCA4 que são receptores de cálcio presentes no retículo sarcoplasmático e membrana celular, respectivamente (MOREIRA; LEBLANC; OUELLETTE, 2009). A retirada de cálcio do citosol da célula mediante a presença do parasita internalizado, confere inibição da PKC e ativação da Proteína quinase ζ (PK ζ), sendo esta a responsável pelo aumento da expressão de citocinas anti-inflamatórias responsáveis pela ativação de resposta imune do tipo Th2 (ROY et al., 2014)

A arginase é capaz de competir e interferir nas vias de utilização de L-arginina das células, levando à depleção desta e, conseqüentemente, a diminuição da produção de óxido nítrico e o aumento da produção de poliaminas (VINCENDEAU et al., 2003). Uma vez que a L-arginina é necessária para a produção de óxido nítrico pela enzima óxido nítrico sintase, e as poliaminas são essenciais para o crescimento e diferenciação e crescimento destes parasitas (COLOTTI; ILARI, 2011).

A evolução da infecção pode tomar vários rumos, dependendo dos tipos de células, da qualidade da resposta mediada por citocinas envolvidas na resposta imune e da espécie de leishmania envolvida no processo (COLOTTI; ILARI, 2011). Contudo o paradigma entre as respostas Th1 e Th2 está longe de explicar a imunopatologia e cura da infecção por leishmania. A caracterização bem definida dos papéis das respostas imunes do tipos Th1 e Th2 também é controversa, alguns estudos indicam que um fenótipo Th1 predominante de células T CD4⁺ pode não ser um indicativo de proteção contra a infecção.

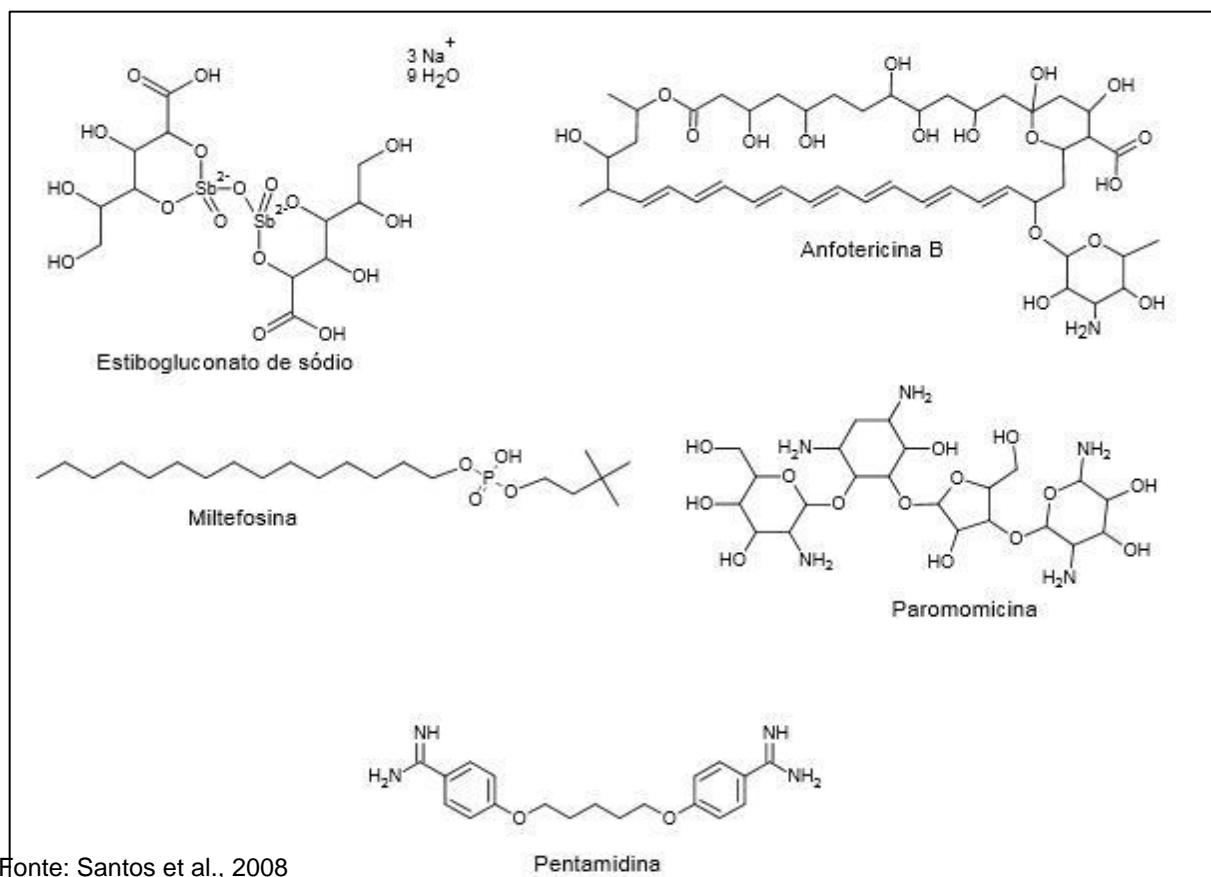
Uma vez conhecendo a imunobiologia induzida pelo parasita, se fazem necessárias investigações farmacológicas que visem atuar em sinergismo com o sistema imune do hospedeiro reduzindo os efeitos colaterais provocados pelos fármacos convencionais.

2.1.5 Tratamento das leishmanioses

Desde o século passado, a terapia das leishmanioses consiste na administração de agentes da família dos antimoniais pentavalentes (Fig. 4), representados por estibogluconato de sódio ou Pentostan[®] e antimoniato de meglumina ou Glucantime[®]. O medicamento disponível no Brasil é o antimoniato

de N-metilglucamina, que é utilizado para administração parenteral, pois não possui boa absorção oral. O período de tratamento é de vinte a trinta dias, com cerca de 90% de eficácia (DEN BOER et al., 2011).

Figura 4. Estruturas químicas de fármacos utilizados no tratamento das leishmanioses



Fonte: Santos et al., 2008

A ação dos antimoniais pentavalentes é pouco expressiva quando testada *in vitro* sobre formas promastigotas do parasito. No entanto, a atividade observada em formas intracelulares amastigotas é completamente diferente (AMEEN, 2010). A redução de Sb^{5+} em Sb^{3+} em células fagocíticas hospedeiras é provavelmente uma das razões que permite aos antimoniais pentavalentes uma resposta clínica relevante (DECUYPERE et al., 2012). O mecanismo de ação dessa classe de medicamentos envolve a redução do aporte de ATP e GTP, essenciais para a manutenção biológica do protozoário. Os antimoniais agem através de duas vias, primeiramente estimulando os macrófagos infectados a provocar estresse oxidativo no parasito intracelular e também pela ação direta do antimônio reduzido (Sb^{3+}) no equilíbrio redox do microrganismo (DECUYPERE et al., 2012). As desvantagens na terapia da leishmaniose cutânea com antimoniais pentavalentes, deve-se a sua

administração por via parenteral por longo período, o que dificulta o tratamento em zonas rurais, além disso, a hepatotoxicidade é o efeito adverso mais grave, seguido de problemas cardíacos, reações dérmicas locais, anorexia, náuseas, vômitos, mialgia, linfocitose e eosinofilia (NEVES; CALDAS; SAMPAIO, 2009; SIQUEIRA-NETO et al., 2010).

Podemos listar como fármaco de segunda escolha a pentamidina e anfotericina B (Anf B), menos utilizados devido à alta toxicidade e alto custo. A pentamidina apresenta efeitos colaterais severos, como toxicidade renal e hepática, pancreatite, hipotensão, disglícemia e problemas cardíacos. A anfotericina B é efetiva no tratamento de leishmaniose visceral, com toxicidade mais baixa quando encapsulada em lipossomas, porém é um medicamento muito caro e, além disso, não é apropriada para o tratamento de outras formas da doença (SANTOS et al., 2008). A anfotericina B é um agente antimicrobiano poliênico com potente atividade tanto para a forma promastigota extracelular como para a forma amastigota intracelular. O fármaco atua inibindo o metabolismo de ergosterol presente na membrana plasmática do parasito. O tratamento de vinte dias custa cerca de quatrocentos e oitenta dólares (WHO, 2010), dificultando qualquer política de medicamentos embasada nesse esquema terapêutico.

No início deste século, o alquilfosfolípídeo miltefosina, único medicamento oral disponível para o tratamento de leishmaniose visceral, foi registrado na Índia, Europa e América do Sul. É altamente efetivo em crianças, mas pode apresentar complicações gastrintestinais e seu uso em mulheres grávidas é limitado devido à sua teratogenicidade. Além disso, altos índices de desenvolvimento de resistência vêm sendo observados *in vitro* (SANTA-RITA et al., 2004)

A miltefosina se apresenta como único tratamento oral para a leishmaniose visceral (BERMAN, 2005; RAMESH BABU et al., 2008). Trata-se de uma hexafluorocina, cuja eficácia contra a leishmaniose tornou-se conhecida em meados dos anos 80. No entanto, sua comercialização como primeiro agente oral contra a leishmaniose visceral na Índia ocorreu apenas em 2002 e contra leishmaniose cutânea na Colômbia em 2005 (ROATT et al., 2014). As desvantagens e restrições do seu uso incluem risco de teratogenicidade, potencial de desenvolvimento de resistência e estreita janela terapêutica, além disso, não

encontra-se disponível no Brasil (LUQUE-ORTEGA; RIVAS, 2007; NATERA et al., 2007; GODINHO et al., 2012).

A pentamidina é utilizada no tratamento da leishmaniose cutânea com esquema de administração em três doses diárias de 2 a 4 mg/kg intramuscular ou intravenoso, por sete dias consecutivos ou dias alternados. Seu uso contínuo pode induzir diabetes (AMEEN, 2010), porém é considerado uma boa alternativa em relação ao tratamento com antimoniais (ANTINORI; SCHIFANELLA; CORBELLINO, 2012). A paromomicina é um antibiótico aminoglicosídico inicialmente indicado para infecção bacteriana. Seu mecanismo de ação antibacteriano envolve a associação a subunidades ribossomais, interferindo na síntese protéica. Antes de ser desenvolvido para o tratamento da leishmaniose cutânea, já havia indicação de uso para giardíase, amebíase e criptosporidiose (CHAWLA; NGUYEN; GOH, 2011; SINHA; NATH; SANTOS, 2011).

Embora não se conheça amplamente o modo de ação da paromomicina em leishmania, são propostas vias como a interferência na fluidez da membrana, na síntese protéica e no transporte ativo de moléculas (CHAWLA et al., 2011; MAAROUF et al., 1997). O efeito foi relatado em estudos clínicos de fase III na Índia, que demonstraram uma taxa de 94% de eficácia no tratamento intramuscular de leishmaniose visceral (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2008). Grande vantagem no esquema terapêutico para a leishmaniose cutânea é a sua administração tópica, evitando efeitos colaterais de vias sistêmicas, sendo relatada apenas irritação no local da aplicação (AMEEN, 2010; CROFT; OLLIARO, 2011).

Em virtude da onerosidade, da gama de efeitos colaterais e da limitação dos fármacos convencionais, produtos naturais têm sido investigados como fonte de descoberta de novos fármacos.

2.2 Plantas medicinais e produtos naturais: fonte potencial para terapêutica.

Analisando o contexto histórico é possível observar que a utilização de plantas com fins terapêuticos faz parte da evolução humana e foram os primeiros recursos

terapêuticos utilizados pelas civilizações, das quais algumas têm suas próprias referências históricas acerca do uso de plantas medicinais. Estas civilizações ao realizarem experiências com plantas, observaram que algumas destas curavam, matavam ou produziam efeitos colaterais severos (BADKE et al., 2011).

Assim a utilização de plantas com fins terapêuticos é considerada uma prática fitomédica, contudo para que isso ocorra com segurança é necessário a validação de suas propriedades farmacológicas, para o conhecimento dos possíveis efeitos benéficos ou maléficos. Além disso, os profissionais da saúde devem considerar tal prática, observando crenças, valores e estilo de vida (ISERHARD et al., 2009). O crescente interesse por medicamentos de origem vegetais com efeito antiparasitário e a extraordinária diversidade química vegetal, transformam as florestas tropicais em verdadeiros reservatórios de novos princípios ativos. O Brasil é um país rico em diversidade cujo território possui cinco principais biomas, sendo designados como floresta amazônica, cerrado, mata atlântica, pantanal e caatinga. Portanto, é uma rica fonte de substâncias ativas. No entanto, este potencial para a descoberta de plantas com atividades farmacológicas é pobremente explorado ou regulamentado, contrastando com o que ocorre em países desenvolvidos (CALIXTO, 2000; RATES 2001; VEIGA-JUNIOR, 2008; MORAIS-BRAGA et al., 2013; SILVA et al., 2014).

No ano de 2006 foi implantada no Brasil, a Política Nacional de Práticas Integrativas e Complementares (PNPIC) no Sistema Único de Saúde (SUS), sendo instituída pela Portaria do Ministério da Saúde (MS) nº 971.3. Esta portaria tem como objetivo ampliar as opções terapêuticas aos usuários do SUS, tais como a acesso às plantas medicinais, a fitoterápicos e a serviços relacionados à fitoterapia, com segurança, na perspectiva da integralidade da atenção à saúde (RODRIGUES; SANTOS; AMARAL, 2006).

Assim, tanto o conhecimento como as potencialidades de uso das plantas medicinais estão longe de serem esgotadas. Novas necessidades certamente encontrarão, na diversidade florística, por meio da descoberta científica o reconhecimento de novas moléculas com atividade terapêutica e com aplicações na indústria farmacêutica tanto no desenvolvimento de fitoterápicos, quanto de novos medicamentos a partir de moléculas isoladas. Para a indústria farmacêutica as plantas foram e continuam sendo de grande relevância, na busca por substâncias ativas, importantes para o desenvolvimento de fármacos e como fonte de matérias-primas

farmacêuticas e adjuvantes farmacêuticos (SCHENKEL, 2004; SIMÕES et al., 2010; DE LIMA; NASCIMENTO; DAVID, 2013).

Os produtos naturais oferecem moléculas com impacto profundo na saúde humana, a natureza produz infinitos metabólitos secundários com propriedades biológicas distintas. Diversos estudos já validaram o efeito de produtos naturais como potenciais fontes de novos e seletivos agentes para o tratamento de doenças tropicais causados por protozoários e outros parasitos (MISHRA et al., 2005).

Como parte da pesquisa por novos e melhores medicamentos com alta viabilidade e baixa toxicidade, o Programa de Doenças Tropicais da Organização Mundial de Saúde (OMS) vem considerando a investigação sobre o uso plantas no tratamento de leishmaniose como essencial e de alta prioridade (OMS, 2012).

Ainda não existe nenhum produto natural licenciado para tratamento da leishmaniose humana. IWU, et al., (1994) citam em sua revisão mais de vinte espécies de plantas que têm demonstrado conter componentes que apresentam atividade significativa contra várias espécies de leishmania.

Os constituintes ativos de algumas destas plantas já foram isolados e suas atividades têm sido confirmadas através de ensaios *in vitro* e *in vivo*, mas para a grande maioria destas plantas tem sido reportada apenas a atividade de extratos *in vitro*, faltando o isolamento dos componentes responsáveis por esta atividade biológica, com subseqüentes estudos para confirmação *in vivo*. Até o momento, os estudos experimentais citados na literatura permitiram a identificação de várias classes de substâncias com atividade antileishmania e entre as mais promissoras estão: os alcaloides isoquinolínicos e β -carbolicos, os glicosídeos iridóides e esteroidais, além das quinolonas, lignanas (Ex. pinoresinol, medioresinol e liriioresinol; Di GIORGIO et al. 2005) e taninos. (IWU; JACKSON; SCHUSTER, 1994; KOLODZIEJ; KIDERLEN, 2005),

2.2.1 Taninos.

Os taninos são polifenóis derivados do metabolismo secundário das plantas, sendo a maior parte derivada do metabolismo da glicose por diferentes reações bioquímicas, que consistem a via do ácido chiquímico ou do acetado, de grande

interesse econômico e ecológico, solúveis em água e com pesos moleculares entre 500 a 3000 Daltons (SIMÕES et al., 2002). Classicamente, as estruturas químicas dos taninos são divididas em dois grupos: hidrolisável e condensado. Os taninos hidrolisáveis consistem em ésteres de ácido gálico e glicosídeos de ácido elágico, formados a partir de shikimato, onde os grupos hidroxil-açúcar são esterificados com ácidos fenólicos (SIMÕES et al., 2003)

Dentre alguns compostos fenólicos importantes encontram-se os ácidos gálico e seus dímeros (ácido digálico ou hexaidroxidifênico e elágico). Sendo caracterizados como lactonas fenólicas de ocorrência natural encontrado na castanha de caju, aroeira-do-sertão, barbatimão e morango, por exemplo, na forma de taninos hidrolisáveis chamados elagitaninos (MURAKAMI et al., 1991; VATTEM et al., 2005; RIBEIRO et al., 2015).

Muitas espécies de plantas que produzem taninos são usadas na medicina popular para diferentes fins. O ácido gálico possui propriedades antioxidantes e/ou antiinflamatória (YANG et al., 2015) antimicrobiana (SARJIT; WANG; DYKES, 2015), propriedades antimutagênicas e anticarcinogênica (LEE; HARRISON; GRINSTEIN, 2003; LU et al., 2010; PAOLINI et al., 2015).

Das atividades biológicas comprovadas do ácido elágico destacam-se: anticarcinogênica, hepatoprotetora, inibidora da DNA topoisomerase (VATTEM et al., 2005; AGGARWAL; SHISHODIA, 2006), antioxidante, anti-inflamatória (PAPOUTSI et al., 2008), gastroproterora (IINO et al., 2001).

A falta de uma vacina segura e eficaz, juntamente com as adversidades existentes nos tratamentos convencionais, vêm despertado para a busca por novos fármacos que visam apresentar potencial ação antileishmania, como também potencial imunomodulador. Nesse contexto o presente trabalho tem como objetivo explorar o potencial antileishmania, citotóxico e imunomodulador do ácido gálico e do ácido elágico.

3 OBJETIVOS:

3.1 Objetivo Geral:

- Investigar a ação antileishmania, citotóxica e imunomoduladora *in vitro* do ácido gálico (AcG) e do ácido elágico (AcE).

3.2 Objetivos Específicos:

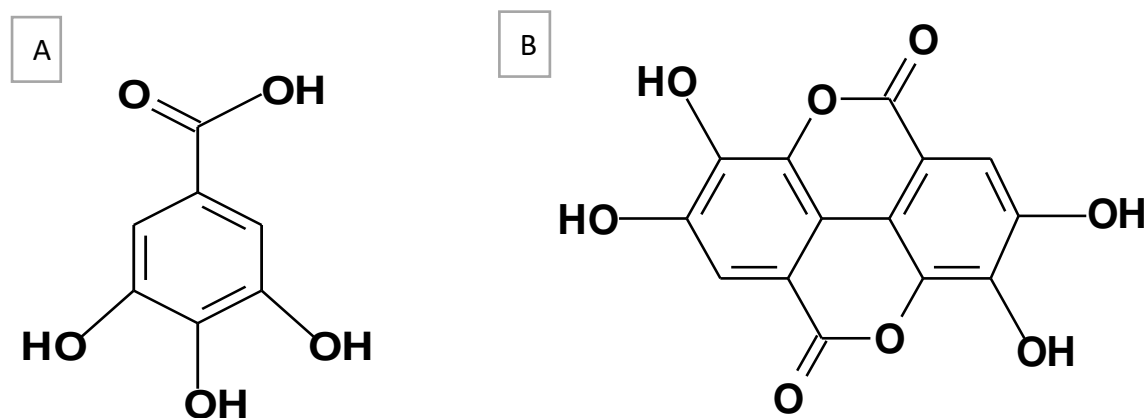
- ❖ Explorar a atividade antileishmania do AcG e AcE sobre formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. major*
- ❖ Observar a morfologia e a integridade do DNA das formas promastigotas após tratamento com AcG e AcE.
- ❖ Avaliar o potencial citotóxico do AcG e AcE sobre macrófagos murinos e hemolítico sobre eritrócitos de carneiro.
- ❖ Investigar a ação do AcG e AcE sobre formas amastigotas internalizadas em macrófagos
- ❖ Avaliar o potencial imunomodulador do AcG e AcE sobre a atividade lisossomal, capacidade fagocítica, síntese de óxido nítrico e aumento de cálcio intracelular em macrófagos pré-tratados.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Substâncias Utilizadas.

Dimetilsulfóxido (DMSO: 99%), foi adquirido da Merck Chemical Company (Alemanha). O meio de cultura Schneider's, meio RPMI (Soro fetal bovino (SFB), MTT (3- (4,5-dimetiltiazol-2-il) 2,5-difeniltetrazólio Bromo, Azul Alamar (Resazurina[®]), Ácido Gálico (AcG), Ácido Elágico (AcE) (Figura 5) e os antibióticos Penicilina e Estreptomicina foram adquiridos da Sigma Chemical (Sigma-Aldrich Brasil). O Fura-2 / AM foi adquirido da Sigma-Aldrich (EUA). O antibiótico Anfotericina B (Anf B 90%), panótico rápido[®] foram adquiridos da Cristália (São Paulo, SP), DNA Lambda e peso molecular foram adquiridos da Invitrogen[®]. O ácido gálico (AcG) e o ácido elágico (AcE) foram diluídos em DMSO a uma concentração de 80 mg/mL para os experimentos.

Figura 5: Estruturas moleculares do ácido gálico (A) e do ácido elágico (B). Essas substâncias são compostos fenólicos derivados do metabolismo secundário de plantas. O AcG possui peso molecular de 170,12 g/Mol e o AcE possui 302,197 g/Mol. O AcE é classificado como um dímero do AcG.



Fonte: ITO, (2011).

4.2 Parasitas e células

Leishmania major (MHOM/IL/80/Friendlin) obtida do Núcleo de Pesquisas em Plantas Medicinais da Universidade Federal do Piauí (NPPM/UFPI) foi utilizada para avaliação da atividade antileishmania. As formas promastigotas foram cultivadas em meio de Schneider's suplementado (10% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de Estreptomicina, incubadas em estufa B.O.D. a 26 °C). Formas amastigotas axênicas de *L. major* foram cultivadas em meio Schneider's (20% de soro fetal bovino (SFB), 100 U/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina incubadas em estufa B.O.D. a 34°C), obtidas após a transformação *in vitro* das formas promastigotas (CARNEIRO et al., 2012). Foram coletados macrófagos murinos das cavidades peritoneais de camundongos BALB/c machos e fêmeas (4 a 5 semanas de idade), após eliciação prévia (72h) pela aplicação de 2 mL de Tioglicolato a 3% via intraperitoneal desses animais, provenientes do biotério setorial do NPPM/UFPI, foi coletado sangue de carneiro (9 meses de idade) do Centro de Ciências Agrárias (CCA/UFPI) localizado em Teresina, PI, Brasil. Todos os protocolos foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal (CEEAPI nº 053/2015).

4.3 Atividade antileishmania do AcG e do AcE sobre formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. major*.

O ensaio foi realizado com formas promastigotas de *L. major* em fase logarítmica de crescimento e formas amastigotas axênicas obtidas através da transformação em cultivo das formas promastigotas na fase estacionária. Os parasitos foram semeados em placas de cultivo celular de 96 poços contendo meio Schneider's suplementado, na quantidade de 1×10^6 leishmania/100 µL de meio. Em seguida o AcG e AcE foram adicionados aos poços em triplicata e realizadas diluições seriadas, atingindo oito faixas de concentrações finais desejadas [800 µg/mL]. A placa foi incubada em estufa demanda bioquímica de oxigênio (B.O.D.) a temperatura de 26 °C para as formas promastigotas e 34 °C para as formas amastigotas axênicas, por 48 h e, restando 6 h para o término deste período, foram adicionados 20 µL de resazurina 1×10^{-3} mol/L, quando incubou-se novamente a placa. A leitura da placa foi realizada num leitor de placas de absorbância Biotek

(modelo ELx800), no comprimento de onda de 550 nm, e os resultados foram expressos em termos de inibição do crescimento (%).

O controle positivo foi realizado com 2 µg/mL de anfotericina B (Anf B) diluído em meio Schneider's contendo 1×10^6 promastigotas ou amastigotas axênicas por poço. Já o controle negativo equivaleu ao meio Schneider's contendo 1×10^6 promastigotas ou amastigotas axênicas por poço e, neste caso, a viabilidade foi de 100% para o parasito. A leitura do branco, para cada concentração e para os controles, fez-se necessária para desprezar a absorbância resultante do próprio meio com interferência ou não dos compostos estudados (SOARES et al., 2007; VALADARES et al., 2011).

4.4 Micrografias da atividade antileishmania sobre formas promastigotas

Micrografias foram obtidas a partir de esfregaços espessos feitos em lâminas após 48 h de ação do AcG e AcE sobre promastigotas de *L. major*, conforme item acima. Para tal, utilizou-se a concentração de 50 µg/mL para ambos e para Anf B foi utilizada a concentração de 0,2 µg/mL.

As lâminas foram sensibilizadas com alíquotas de 10 µL de formas promastigotas de *L. major*, após a centrifugação do volume total (100 µL) contido nos poços da placa, correspondendo a cada tratamento, seguido do descarte do sobrenadante. Deixou-se secar, overnight, em estufa a 27 °C para fixação dos parasitos. A seguir, com objetivo de avaliar possíveis alterações morfológicas nas formas promastigotas realizou-se coloração com panótico rápido®, e leitura feita através de microscopia de luz.

4.5 Avaliação da integridade de DNA de *L. major* após tratamento com AcG e AcE.

Formas promastigotas de *L. major* (5×10^6 células) foram incubados com 800; 100 e 6,25 µg/mL de AcG e AcE durante 48 h, em seguida, recolhidas e congeladas em - 20 °C, Anf B foi utilizada como controle positivo na concentração de 2 µg/mL. O DNA das células foi extraído utilizando kit comercial (Quiagen®) para avaliação da sua integridade, de acordo com o protocolo do fabricante. DNA foi submetido a eletroforese em gel de agarose a 1% a 100 V durante 2 h, após esse período a revelação da corrida foi realizada utilizando o corante fluorescente Diamond™

Nucleic Acid Dye (Promega) e fotodocumetador E-Gel® Imager (Life Technologies) Diamond™ Nucleic Acid Dye, utilizando peso molecular de 1 Kb e DNA lambda como controle endógeno (Invitrogen®) (EBRAHIMISADR; GHAFARIFAR; MOHAMMAD HASSAN, 2013).

4. 6 Determinação da Citotoxicidade

4. 6. 1 Citotoxicidade sobre macrófagos e Índice de Seletividade (IS).

A avaliação da citotoxicidade foi realizada em placas de 96 poços utilizando o ensaio com o MTT. Foram incubados 2×10^5 macrófagos por poço em 100 μ L de meio RPMI 1640 (suplementado com 10% de SFB e 10.000 UI de penicilina e 1.000 UI de estreptomicina) em estufa a 37 °C e 5% de CO₂, durante 4 h para a adesão celular. Após esse período retirou-se o sobrenadante para remoção das células que não aderiram. AcG e AcE foram diluídos em meio RPMI suplementado, adicionados à placa contendo os macrófagos em concentrações seriadas atingindo cinco faixas de concentrações finais [100 μ g/mL], e incubados a 37 °C e 5% de CO₂ durante 48 h. Após esse período, a citotoxicidade foi avaliada por adição de 10 % MTT [5 mg/mL] diluído em 100 μ L de meio RPMI e incubou-se novamente a placa durante 4 h a 37 °C e 5% de CO₂. Passado esse período, o sobrenadante foi descartado e os cristais de formazan foram dissolvidos por adição de 100 μ L de DMSO. Finalmente, a absorvância (550 nm) foi medida utilizando um leitor de placas Biotek (ELx800). O índice de seletividade de cada tratamento foi calculado dividindo a concentração citotóxica média (CC₅₀) observada para macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c pela concentração inibitória média (CI₅₀), calculada para as diferentes formas de apresentação do parasita (OLIVEIRA et al., 2017).

4. 6. 2 Citotoxicidade sobre eritrócitos de carneiro.

Para a avaliação da atividade hemolítica foram utilizados eritrócitos de carneiro, coletado com anticoagulante (EDTA). Após a coleta, os eritrócitos foram diluídos em 80 μ L de PBS, ajustando a concentração do hematócrito para 5% de hemácias. Em seguida foram adicionadas AcG e o AcE, em concentrações seriadas, atingindo oito faixas de concentrações finais [400 μ g/mL], diluídas num volume de 20 μ L de PBS. As amostras foram incubadas durante 1 h a 37 °C, após esse período adicionou-se 200 μ L de PBS para interromper a reação. Em seguida, as amostras foram centrifugadas a 1500 RPM, durante 10 min a 4 °C. Após a centrifugação

transferiu-se o sobrenadante de cada amostra para uma placa de 96 poços onde realizou-se a leitura na absorvância (550 nm), utilizando um leitor de placas Biotek (ELx800). A ausência (controle negativo) e 100% de hemólise (controle positivo) foram determinadas, substituindo a solução de amostra testada com igual volume de PBS e água Milli-Q estéril, respectivamente. Os resultados foram expressos em porcentagem e em concentração hemolítica média (CH₅₀) considerando o controle positivo como 100% de hemólise (LOFGREN et al., 2008)

4. 7 Atividade do AcG e AcE sobre macrófagos infectados por *L. major*

Os macrófagos foram plaqueados em placas de cultura de 24 poços numa concentração de 2×10^5 células/poço em 500 μ L de RPMI suplementado, contendo lamínulas redondas estéreis de 13 mm. As placas de cultura foram incubadas a 37 °C e 5% de CO₂ durante 4 h para a adesão celular. Os macrófagos aderidos foram então incubados com um novo meio contendo amastigotas axênicas numa razão de 10 amastigotas para 1 macrófago a 5% de CO₂ e 37 °C, *overnight*. Passado esse período, o meio foi subseqüentemente aspirado para remover parasitas não internalizados. A cultura infectada foi incubada com os valores correspondentes de 15; 30 e 60 μ g/mL de AcG (concentrações correspondentes a $\frac{1}{2}$ Cl₅₀; Cl₅₀ e $2 \times$ Cl₅₀ sobre as formas amastigotas axênicas) e 1,75; 3,5; E 7 μ g/mL de AcE (concentrações correspondentes a $\frac{1}{4}$ Cl₅₀; $\frac{1}{2}$ Cl₅₀ e Cl₅₀ sobre as formas amastigotas axênicas), e anfotericina na concentração de 0,2 μ g/mL. Após este período, as lamínulas foram removidas e coradas utilizando o panótico rápido®. Para cada tratamento, contou-se o número de macrófagos infectados (infecção) e a carga parasitária (infectividade) percorrendo os campos das amostras até atingir a contagem de 100 macrófagos, utilizando microscopia óptica (CARNEIRO et al., 2012).

4.8 Avaliação de parâmetros de ativação de macrófagos.

4. 8. 1 Preparo de soluções

A solução estoque de corante vermelho neutro (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) foi preparada pela solubilização de 0,002 g do corante em 1 mL de DMSO. A solução de extração utilizada nos itens 4.9.2 e 4.9.3 constitui-se de ácido acético glacial 96% (1% v/v) e etanol PA (50% v/v) dissolvidos em água bidestilada. O

zimosan (Sigma-Aldrich, St. Louis, EUA) corado para os ensaios de capacidade fagocítica foi obtido pela diluição de 0,3 mL da solução estoque de vermelho neutro e 0,02 g de zimosan em 3 mL de PBS, já o fixador utilizado foi o de Baker formol-cálcio constituído por formaldeído 4% (v/v), cloreto de sódio 2% (p/v) e acetato de cálcio 1% (p/v) em água destilada (GRANDO et al., 2009).

4. 8. 2 Avaliação da atividade lisossomal

Macrófagos peritoneais foram plaqueados na quantidade de 2×10^5 por poço numa placa de 96 poços e incubados com AcG e AcE e realizadas diluições seriadas, atingindo cinco faixas de concentrações finais [100 µg/mL]. Após 48 h de incubação em estufa a 37 °C e a 5% de CO₂, acrescentou-se 10 µL de solução de vermelho neutro a 2% de DMSO e incubou-se por 30 min. Transcorrido esse tempo, o sobrenadante foi descartado, os poços foram lavados com salina 0,9% a 37 °C e adicionou-se 100 µL de solução de extração para solubilizar o vermelho neutro presente no interior das vesículas de secreção lisossomais. Após 30 min em agitador de Kline a placa foi lida no leitor de placas Biotek (ELx800) a 550 nm. (BONATTO et al., 2004).

4. 8. 3 Determinação da capacidade fagocítica

Macrófagos peritoneais foram plaqueados na quantidade de 2×10^5 por poço numa placa de 96 poços e incubados com AcG e AcE e realizadas diluições seriadas, atingindo seis faixas de concentrações finais [100 µg/mL]. Após 48 h de incubação em estufa a 37 °C e a 5% de CO₂, acrescentou-se 10 µL de solução de zimosan corado e incubou-se por 30 min a 37 °C. Após este procedimento, foram adicionados 100 µL de fixador de Baker para interromper o processo de fagocitose e, 30 min depois, a placa foi lavada com salina 0,9 % a fim de remover o zimosan e o vermelho neutro não fagocitados pelos macrófagos. Removeu-se o sobrenadante, e adicionou-se 100 µL de solução de extração e após solubilização em agitador de Kline a placa foi lida no leitor de placas Biotek (ELx800) a 550 nm (GRANDO et al., 2009).

4. 8. 4 Avaliação da indução da síntese de óxido nítrico

Macrófagos peritoneais foram plaqueados na quantidade de 2×10^5 por poço numa placa de 96 poços e incubados com AcG e AcE e realizadas diluições seriadas, atingindo quatro faixas de concentrações finais (6,25; 12,5; 25; 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ para AcG e 0,78; 1,25; 3,125 e 6,25 $\mu\text{g/mL}$ para AcE), na presença ou na ausência de formas promastigotas de *L. major* na concentração de 1×10^6 por poço. Transcorrido 24 h de incubação a 37 °C e 5% de CO_2 , transferiu-se os sobrenadantes do cultivo celular para outra placa de 96 poços para a dosagem de nitrito. A curva-padrão foi preparada com nitrito de sódio em meio RPMI à concentrações variadas de 1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 e 150 μM diluídos em meio RPMI. No momento da dosagem misturou-se partes iguais das amostras (sobrenadantes) ou das soluções preparadas para obtenção da curva-padrão com o mesmo volume do reagente de Griess (1% Sulfanilamida em H_3PO_4 10% (v:v) em água Milli-Q®, adicionados em partes iguais a 0,1% naftilenodiamino em água Milli-Q®) e fez-se a leitura das absorvâncias em leitor de placas Biotek (ELx800) a 550 nm, o resultado foi plotado em porcentagem de produção de nitrito (SOARES et al., 2007).

4. 8. 5 Quantificação de cálcio citoplasmático

Macrófagos infectados ou não por *L. major*, conforme protocolo descrito anteriormente, foram tratados com 30 $\mu\text{g/mL}$ de AcG e 7 $\mu\text{g/mL}$ de AcE (Valores correspondentes a CI_{50} de AcG e AcE sobre as formas amastigotas axênicas) e incubados por 48 h em estufa a 5% de CO_2 a 37 °C. A Anf B foi utilizada como controle positivo na concentração de 0,2 $\mu\text{g/mL}$. O controle negativo não recebeu nenhum tratamento. Utilizou-se o DMSO na concentração de 60 $\mu\text{g/mL}$ para confrontar as análises, pois este é utilizado como veículo de diluição das substâncias. Após esse período removeu-se o sobrenadante da placa e foi adicionado 500 μL de meio RPMI contendo marcador Fura-2/AM (10 μM) na concentração de 1 mM e incubou-se a placa novamente por 30 min. Os poços da placa foram lavados 2x com PBS estéril e as lamínulas foram retiradas e levadas para microscópio confocal Disk Scanning unit (DSU) de epifluorescência (modelo IX81, Olympus, Japão) acoplado a uma câmera Charge-Coupled Devide (CCD) de alta velocidade (Hamamatsu, Japão). Para a avaliação dos níveis de Ca^{2+} citoplasmático em macrófagos, foram utilizados filtros de excitação (340/380nm), e

a fluorescência emitida (525 nm) quantificada por software (Cell[^]R, Olympus, Japão).

4. 9 Análise estatística

Todos os ensaios foram realizados em triplicata em três experimentos independentes. A concentração inibitória médias (CI_{50}), concentração citotóxica média (CC_{50}) com limite de confiança de 95%, foram calculadas utilizando regressão de probitos do programa SPSS 13.0. O índice de seletividade foi calculado dividindo a CI_{50} pela CC_{50} . Foram realizadas análises de variância ANOVA seguida pelo teste de Bonferroni, através do programa *GraphPad Prism* versão 5.0, tomando-se o valor de $p < 0,05$ como nível máximo de significância estatística.

5 RESULTADOS

5. 1 Ensaio de atividade antileishmania

O AcG e AcE demonstraram potencial citotóxico para ambas as formas de *L. major*, dependente da concentração. Houve 100% de inibição do crescimento das formas promastigotas na concentração de 800 µg/mL na presença de AcG, também de igual forma, o AcE promoveu essa inibição a partir da concentração de 100 µg/mL. Em todas as concentrações utilizadas foram significativamente capazes de inibir o crescimento de formas promastigotas de *L. major*. A anf B apresentou inibição do crescimento de formas promastigotas em cerca de 90% na concentração de 2 µg/mL (Figura 6A). As concentrações inibitórias 50 (CI₅₀) obtidas foram: 16,408 µg/mL para AcG; 9,812 µg/mL para AcE e 1,742 µg/mL para Anf B.

Resultado semelhante foi observado sobre as formas amastigotas axênicas de *L. major* (Figura 6B), demonstrando também ação dependente da concentração. O AcG induziu a morte de 100% dos parasitas na concentração de 800 µg/mL. Para o AcE a indução de 100% de morte ocorreu a partir da concentração de 100 µg/mL, mantendo a ação nas concentrações crescentes. Todas as concentrações testadas apresentaram resultados significativos na indução de morte de formas amastigotas de *L. major*. A anfotericina B induziu morte celular cerca de 90% utilizando a concentração de 2 µg/mL. Os resultados encontrados para as CI₅₀ de AcG, AcE e Anf B foram, respectivamente: 29,527; 6,798 e 0,16 µg/mL.

Além de inibir o crescimento das formas promastigotas o AcG e AcE foram capazes de provocar alterações na morfologia do parasita, tornando-o arredondado ou amorfo e sem flagelo visível. Conforme mostram as figuras através da coloração com panótico rápido® (Figura 7C e 7D), quando comparados com o controle negativo (Figura 7A) e anfotericina B (Figura 7B). Quando avaliada a integridade do DNA, observou-se que os ácidos, aparentemente, não provocaram degradação do DNA das formas promastigotas, pois não se observou a formação de bandas inespecíficas nas concentrações testadas (Figura 8), sugerindo que o AcG e do AcE não apresentam ação sobre o DNA dos parasitas.

Figura 6: Atividade antileishmania do AcG e AcE sobre formas promastigotas (A) e amastigotas axênicas (B) de *L. major*. Os parasitas (1×10^6) formas expostos a diferentes concentrações das substâncias por 48h e a viabilidade celular foi avaliada por ação da Resazurina®. Anf B foi utilizada como controle positivo na concentração de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$. AcG, AcE e Anf B * $P < 0.05$ vs. controle; ** $P < 0.01$ vs. controle; *** $P < 0.001$ vs. Controle.

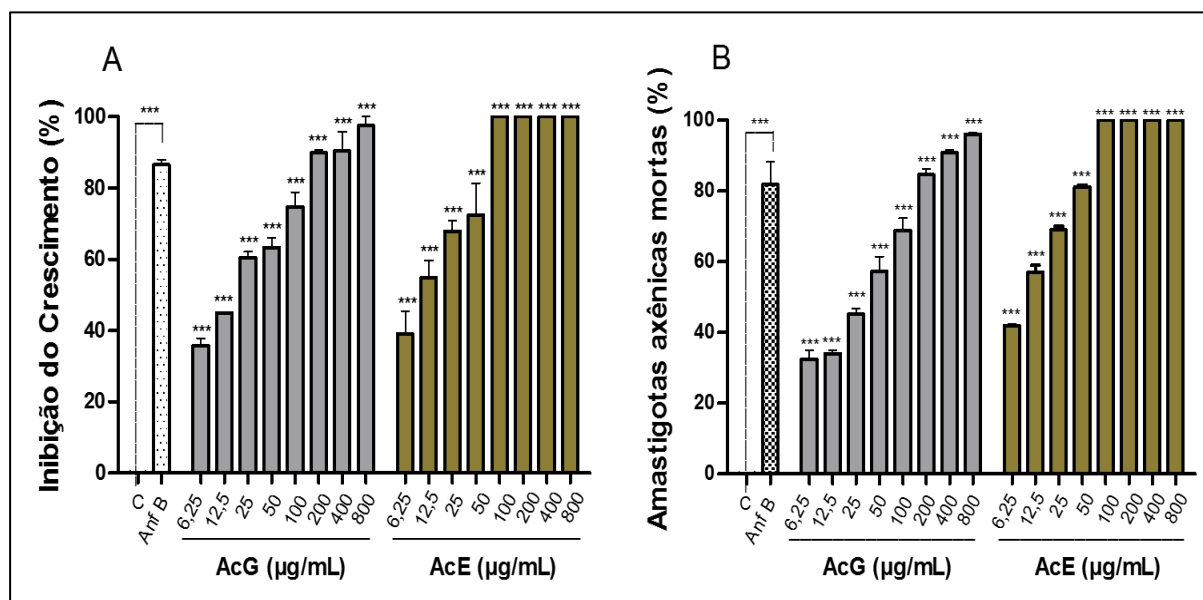


Figura 7: Formas promastigotas de *L. major* coradas com panótico rápido® (Controle - A) após 48h de incubação com 0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Anf B (B) e 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AcG (C) e AcE (D). Aumento 1000x.

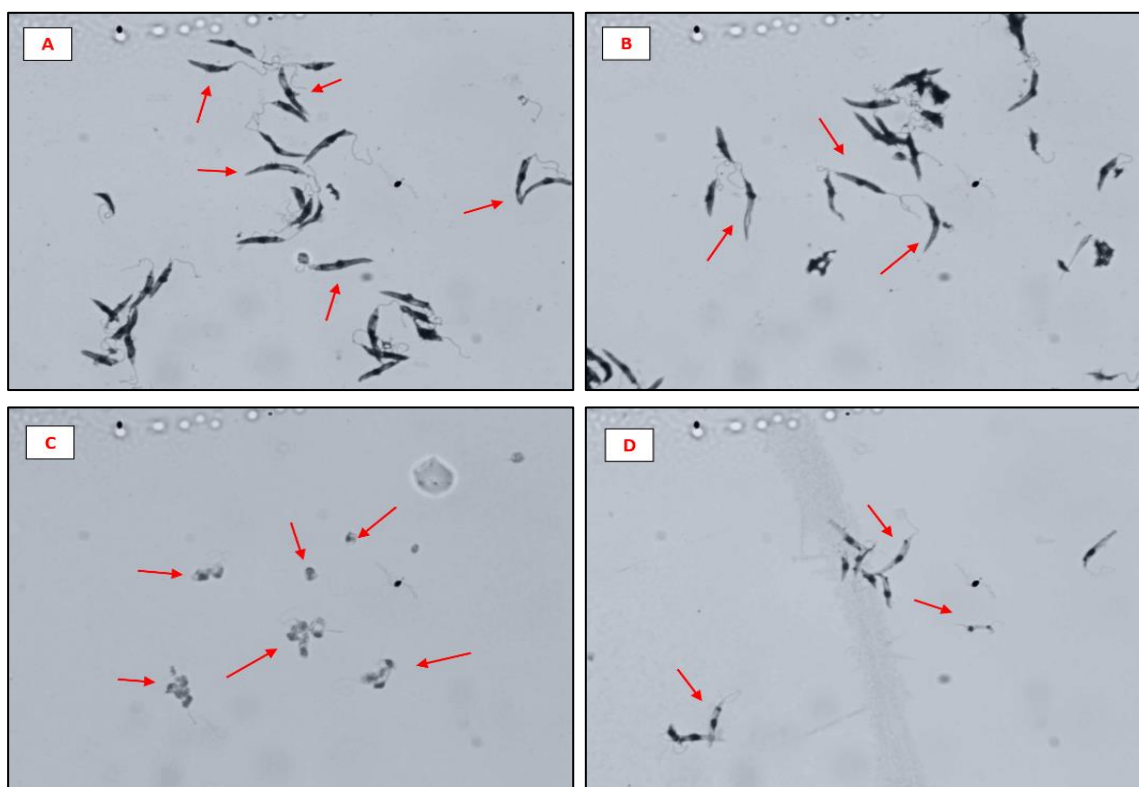
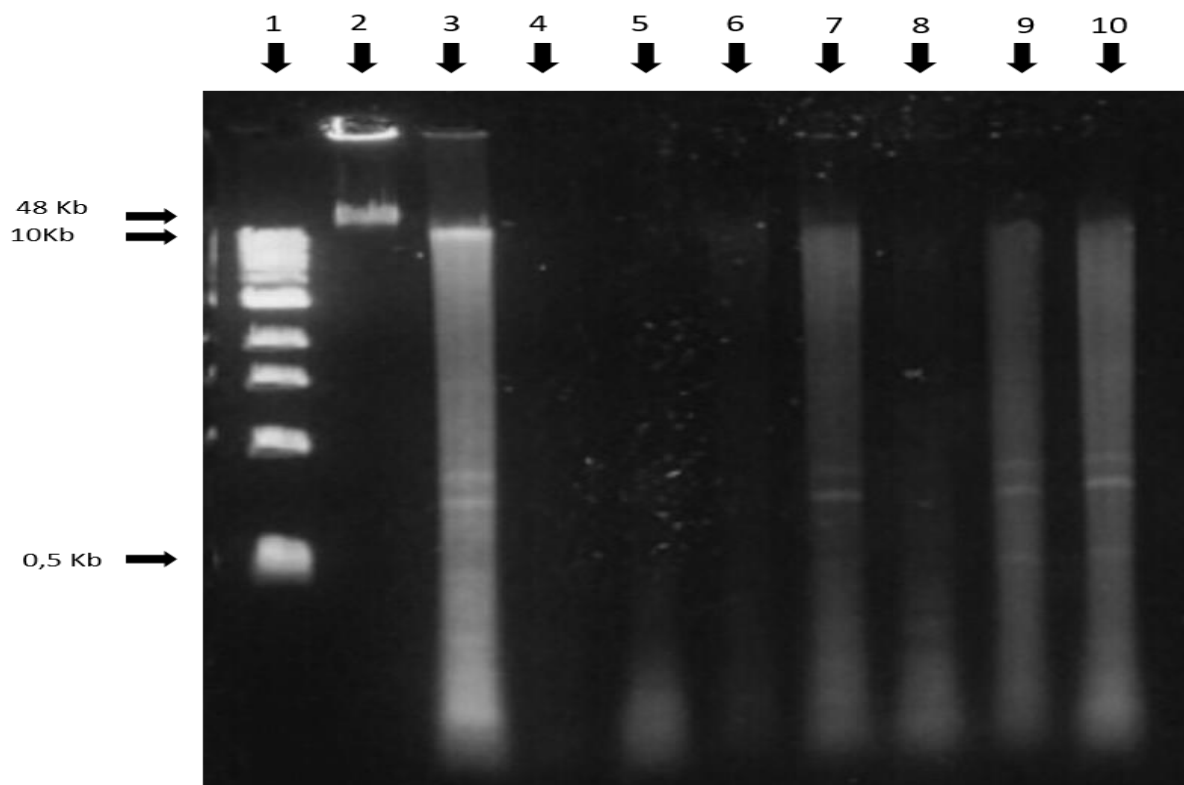


Figura 8: Gel de agarose submetido a eletroforese a 100 V durante 2h. Peso molecular – 1 Kb (1); DNA λ - 48 Kb (2); Controle negativo (3); Anf B [2 $\mu\text{g}/\text{mL}$] (4). DNA obtido de formas promastigotas de *L. major* após 48 h de incubação, tratadas com 800 (5); 100 (6) e 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (7) de AcG e 800 (8); 100 (9) e 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (10) de AcE. A Anf B foi usada como controle positivo na concentração de 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$.



5. 2 Determinação da citotoxicidade

Os resultados dos ensaios de citotoxicidade do AcG e AcE sobre macrófagos peritoneais murinos e eritrócitos de carneiro estão demonstrados na Figura 9. Na ação sobre os macrófagos o AcG demonstrou citotoxicidade significativa a partir da concentração de 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$, o valor da CC_{50} foi de 126,556 $\mu\text{g}/\text{mL}$, enquanto o AcE reduziu a viabilidade dos macrófagos a partir da concentração de 6,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$, resultando no valor de CC_{50} de 23,811 $\mu\text{g}/\text{mL}$. A Anf B apresentou alta toxicidade sobre os macrófagos murinos, apresentando CC_{50} de 8,750 $\mu\text{g}/\text{mL}$. AcG, AcE e Anf B não apresentaram toxicidade sobre os eritrócitos de carneiro. O índice de seletividade representa o quanto a substância é mais tóxica para o parasita do que para os macrófagos. O AcG, AcE e Anf B demonstraram mais seletividade para as formas amastigotas axênicas e promastigotas de *L. major*, do que para os macrófagos murinos (Tabela 1).

Figura 9: Efeitos citotóxicos de AcG e AcE contra macrófagos peritoneais murinos (A) e eritrócitos de carneiro (B). Macrófagos foram incubados por 48 h na presença de diferentes concentrações. A viabilidade dos macrófagos foi mensurada pelo sal tetrasólcico (MTT). Resultados representam média \pm E.P.M de três experimentos realizados em triplicata.

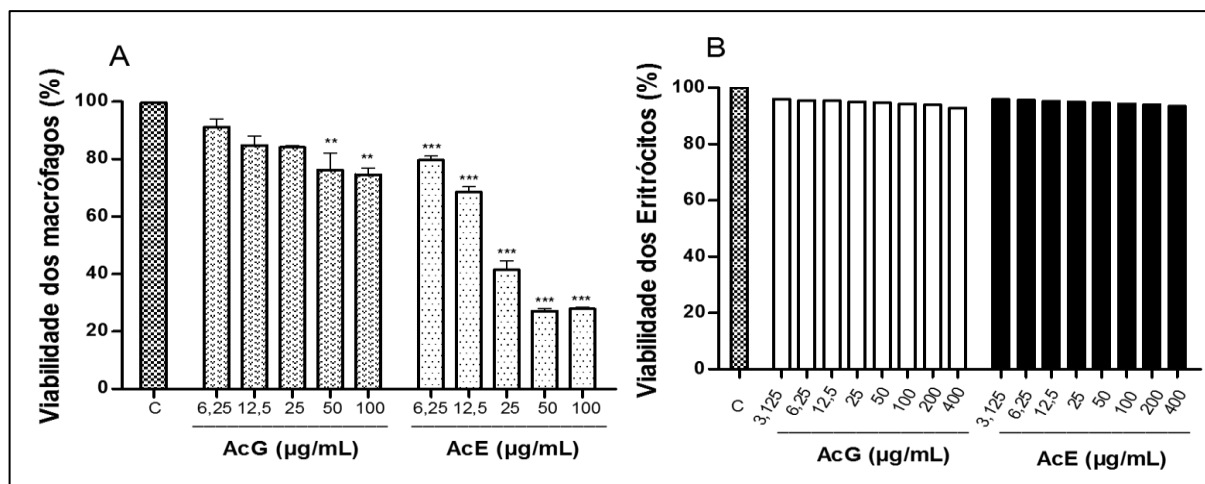


Tabela 1: Atividade antileishmania, efeitos citotóxicos sobre células de mamíferos e valores de índice de

Substâncias	Macrófagos	Eritrócitos	Promastigotas	Amastigotas axênicas	Amastigotas internalizadas		
	CC ₅₀ µg/mL	CH ₅₀ µg/mL	CI ₅₀ µg/mL	CI ₅₀ µg/mL	CI ₅₀ µg/mL	IS _m	IS _e
AcG	126,556	NT ¹	16,408	29,527	5,042	25	ND ²
AcE	23,811	NT ¹	9,812	6,798	0,928	26	ND ²
Anf B	8,750	NT ¹	1,742	0,16	0,16	54,6	ND ²

seletividade calculados para AcG e AcE.

IS_m (índice de seletividade) CC₅₀/CI₅₀

IS_e (índice de seletividade) CH₅₀/CI₅₀

1 Não-tóxico

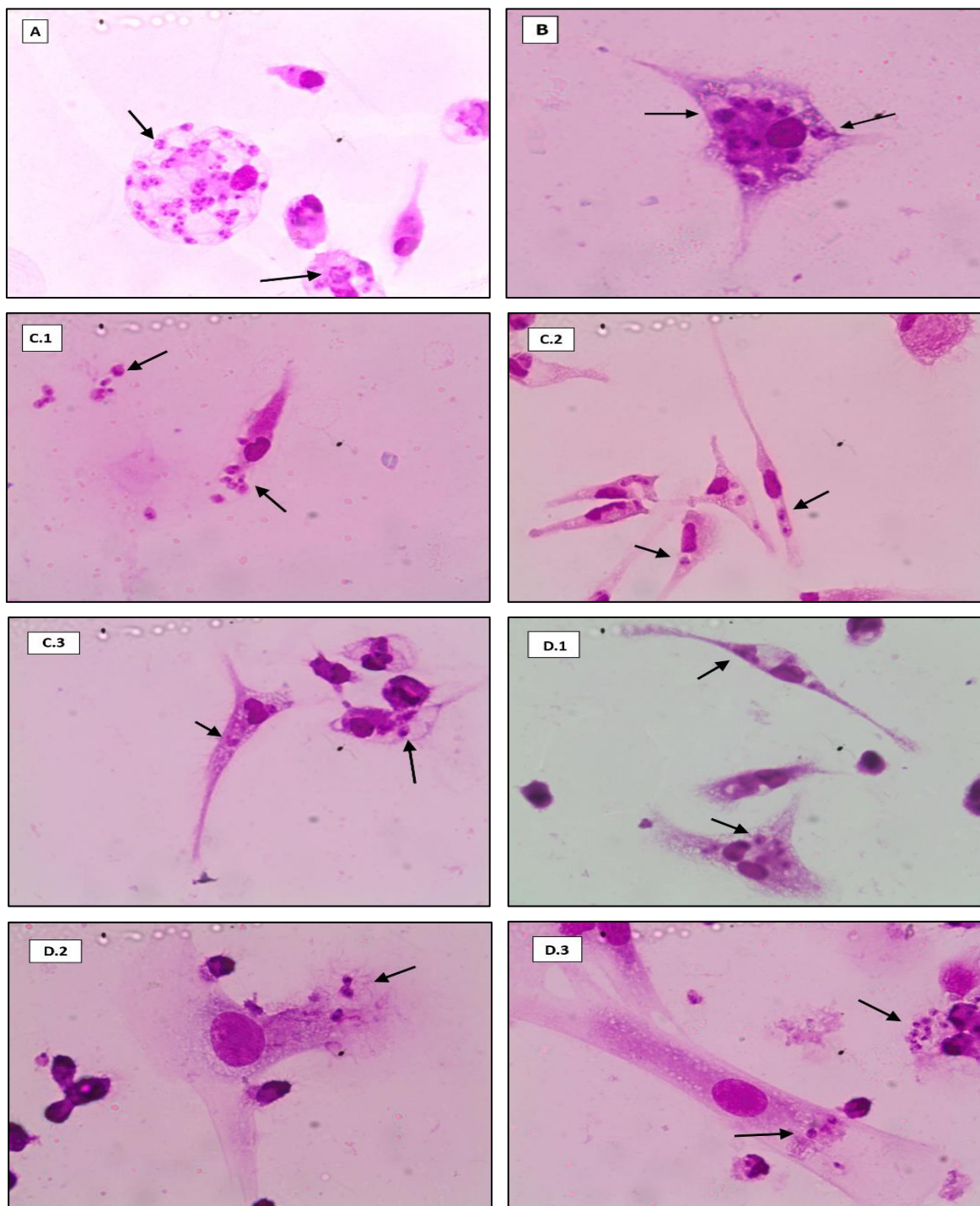
2 Não determinado

5. 3 Efeitos sobre a infecção e a infectividade de macrófagos.

AcG e AcE foram capazes de reduzir a infecção e infectividade de macrófagos parasitados por *L. major* (Figura 10). O controle negativo obteve 100% de células parasitadas, enquanto que a concentração 0,2 µg/mL de Anf B reduziu esse número para aproximadamente 39%. A redução das células parasitadas tratadas com AcG e AcE foram dependentes da concentração utilizada. Em suma, as células tratadas com AcG apresentaram parasitismo em torno de 44, 37 e 25%, após serem tratadas nas concentrações correspondentes a 15; 30 e 60 µg/mL, respectivamente. Os valores

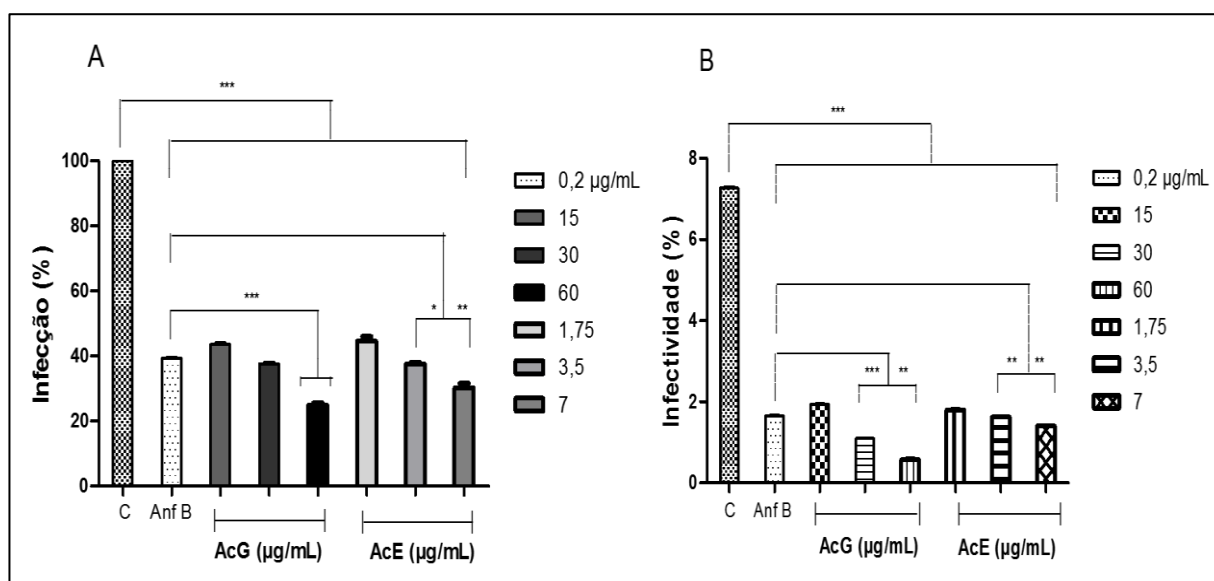
obtidos para o tratamento com AcE foram de 44, 38 e 30% correspondendo a concentração de 1,75; 3,5 e 7 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (Figura 11A).

Figura 10: Macrófagos experimentalmente infectados por *L. major* (A). Anf B foi utilizada como controle positivo na concentração de 0,2 $\mu\text{g/mL}$ (B). Para o tratamento com AcG foram utilizadas as concentrações de 15 (C.1); 30 (C.2) e 60 $\mu\text{g/mL}$ (C.3). O AcE foi utilizado nas concentrações de 1,75 (D.1); 3,5 (D.2) e 7 $\mu\text{g/mL}$ (D.3). As setas indicam as formas amastigotas internalizadas. Aumento 1000x.



Ao analisar a infectividade, o controle obteve em média 7 amastigotas/macrófago. A Anf B na concentração de 0,2 $\mu\text{g/mL}$ reduziu essa quantidade de parasitas para aproximadamente 2 amastigotas/macrófago. O AcG reduziu a quantidade de amastigotas dependente da concentração, em média, 2 amastigotas/macrófagos no tratamento utilizando 15 $\mu\text{g/mL}$, quando utilizou-se 30 $\mu\text{g/mL}$ essa quantidade diminuiu para a média de 1,1 e 0,5 amastigotas/macrófagos, quando tratados com 60 $\mu\text{g/mL}$. Para o AcE, a quantidade de amastigotas/macrófagos correspondentes ao tratamento com 1,75 $\mu\text{g/mL}$ foi de 1,80; no tratamento com a concentração de 3 $\mu\text{g/mL}$ foi de 1,64 e 1,40 amastigotas/macrófagos quando tratados com o valor de 7 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 11B). A CI_{50} calculada para o AcG, AcE e Anf B sobre a infectividade foram, respectivamente 5,042, 0,928 $\mu\text{g/mL}$ e 0,16 $\mu\text{g/mL}$. O AcG, AcE e Anf B demonstraram mais seletividade para os parasitas do que para as células de mamíferos, resultando nos valores 25, 26 e 54,6 , respectivamente, sendo o índice de seletividade determinado pela razão da CC_{50} sobre a CI_{50} . (Tabela 1).

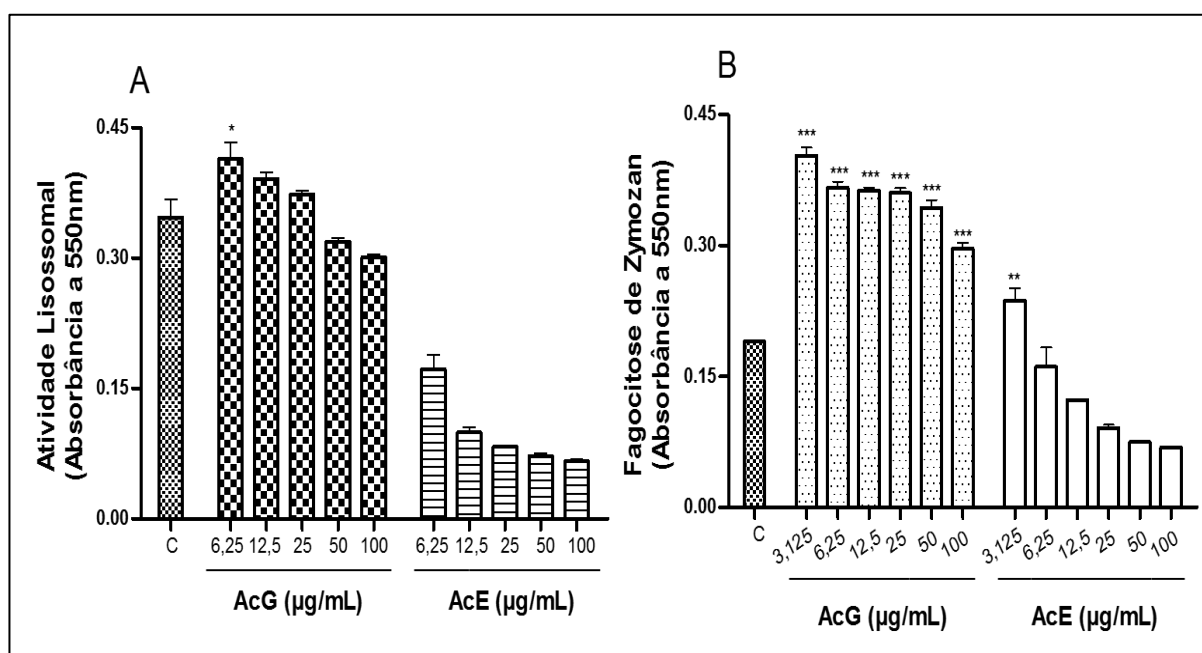
Figura 11: Efeitos de AcG, AcE e anf B como droga de referência, para avaliar a infecção (macrófagos infectados (A) e infectividade (B) no tratamento de macrófagos murinos infectados por *L. major*. As células foram tratadas durante 48 h de incubação com concentrações correspondentes aos valores de $\frac{1}{2} CI_{50}$, $1 \times CI_{50}$ e $2 \times CI_{50}$ para o AcG e $\frac{1}{4} CI_{50}$, $\frac{1}{2} CI_{50}$ e $1 \times CI_{50}$ para AcE obtidos sobre as formas amastigotas axênicas de *L. major*. A anf B foi utilizada a concentração correspondente ao seu valor de CI_{50} (0,2 $\mu\text{g/mL}$) sobre as formas amastigotas do parasita. Os resultados representam as médias \pm E.P.M em três experimentos realizados em triplicata * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$.



5. 4 Atividade Lisossomal e determinação da Capacidade fagocítica.

Parâmetros de ativação de macrófagos e imunomodulação, tais como aumento do volume lisossomal e fagocitose foram avaliados com base na retenção de vermelho neutro e de partículas de zymozan pelos macrófagos, como mostra a Figura 12. O AcG foi capaz de aumentar o volume lisossomal dos macrófagos na concentração de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 12A), enquanto que no AcE não houve retenção de vermelho neutro nas vesículas secretórias dos macrófagos (Figura 12B). Na avaliação da capacidade de fagocitose de Zymozan, o AcG induziu o aumento em todas as concentrações testadas, similarmente o AcE apresentou aumento na concentração de 3,125 $\mu\text{g/mL}$.

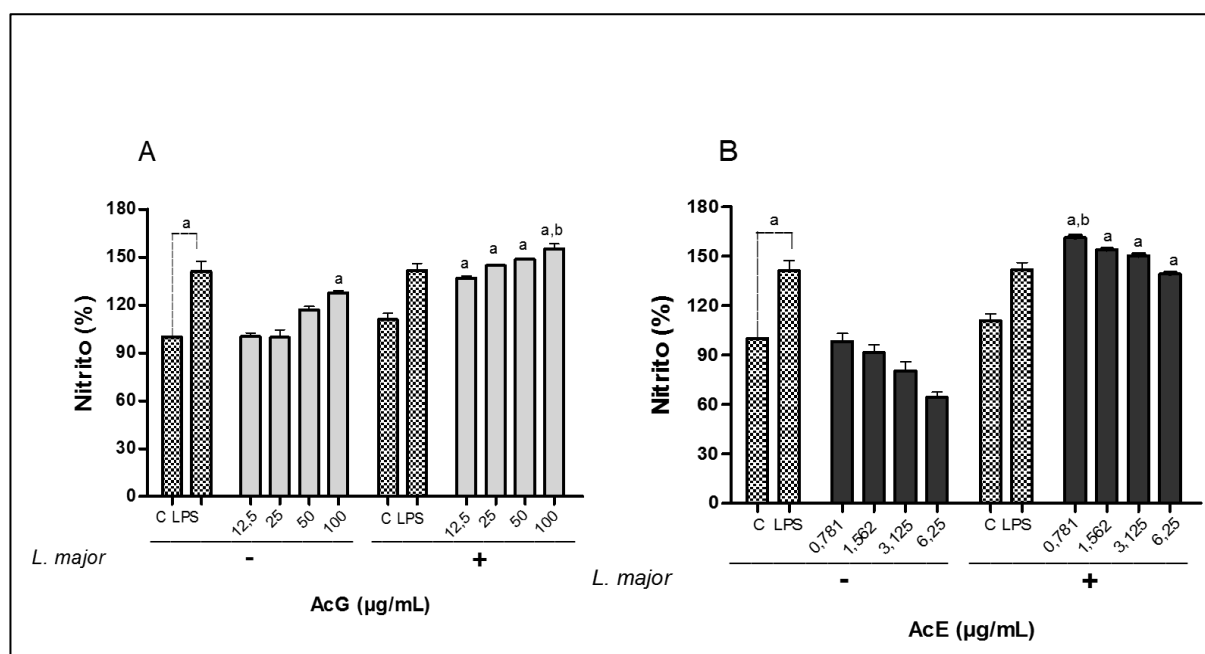
Figura 12: A influência de AcG e AcE sobre o volume lisossomal (A) e atividade fagocítica (B). Macrófagos peritoneais murinos foram tratados com concentração variadas por 48 h. Volume lisossomal e capacidade fagocítica foram analisados por espectrofotometria pela quantificação aumentada pelo corante vermelho neutro (VN), seguida de solubilização pela solução de extração. A fagocitose foi analisada pela incorporação de partículas de zymozan ao vermelho neutro, solubilizado pela solução de extração. Resultados representam média \pm E. P. M. de três experimentos realizado em triplicata, * $P < 0,05$; ** $P < 0,01$; *** $P < 0,001$ vs. Controle. C = controle.



5. 5 Quantificação da produção de óxido nítrico (NO).

A produção de óxido nítrico (NO), um índice de ativação de macrófagos, foi quantificado pela mensuração das concentrações de nitrito através da incubação de macrófagos com AcG e AcE na presença ou na ausência de formas promastigotas de *L. major*. O AcG aumentou significativamente a produção de nitrito na concentração de 100 µg/mL na ausência de leishmania, já na presença do parasita a indução da síntese de NO ocorreu em todas as concentrações testadas (Figura 13A). Os macrófagos tratados com AcE não demonstraram aumento na produção de nitrito, já quando incubados na presença do parasita houve significativa produção de NO em todas as concentrações testadas (Figura 13B). O lipopolisacáride bacteriano de *Escherichia coli* (LPS) foi utilizado como controle positivo, demonstrando alta produção de nitrito.

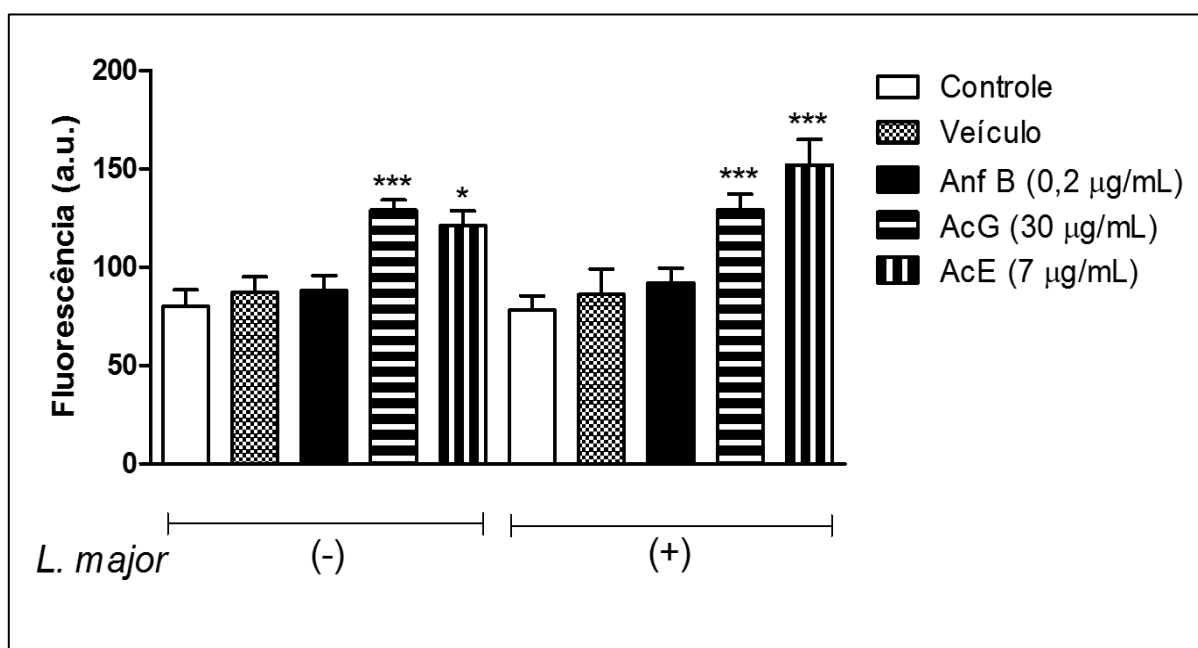
Figura 13: Produção de óxido nítrico de macrófagos peritoneais murinos tratados com AcG (A) e AcE (B) por 24 h na presença (+) ou ausência (-) de formas promastigotas de *L. major*. Após esse período o sobrenadante da cultura foi misturado em partes iguais com o reagente de Griess. LPS – lipopolisacáride bacteriano (2 µg/mL). Os resultados apresentam a média ± E. P. M. em três experimentos realizados em triplicata. ^aP < 0,05 AcG e AcE vs células com e sem estímulo por *Leishmania* ^bP < 0,05 AcG e AcE vs LPS com e sem estímulo por leishmania.



5. 6 Quantificação de cálcio citoplasmático.

Os níveis citoplasmáticos de Ca^{2+} ($[\text{Ca}^{2+}]_i$), foi quantificado através da marcação com Fura-2/AM (10 μM) em macrófagos infectados ou não por *L. major*, na presença das substâncias avaliadas (Figura 10). O controle negativo, DMSO (60 $\mu\text{g}/\text{mL}$) e Anf B (0,2 $\mu\text{g}/\text{mL}$) não promoveram alteração sobre $[\text{Ca}^{2+}]_i$, pelo contrário, notou-se discreta diminuição na marcação deste, quando observado nas células infectadas para o controle negativo e DMSO. Em contrapartida observou-se aumento significativo do cálcio citoplasmático com epifluorescência de 130 (a.u.) nos macrófagos infectados e não-infectandos tratados com 30 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AcG. Esse aumento foi observado também nas células infectadas tratadas com 7 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de AcE com epifluorescência de 120 unidades de absorvância (a.u.) para os macrófagos não infectados e com epifluorescência em torno de 150 a.u. para os macrófagos infectados.

Figura 14: Quantificação de cálcio citoplasmático em macrófagos tratados por 48 h com veículo (DMSO 60 $\mu\text{g}/\text{mL}$), Anf B, AcG e AcE, na ausência (-) ou presença (+) de formas amastigotas de *L. major* internalizadas. Após esse período o sobrenadante da cultura foi removido e adicionando RPMI contendo Fura-2/AM (10 μM), as lamínulas foram avaliadas em microscópio confocal utilizando os filtros de 340/380 nm. Os resultados apresentam a média \pm E. P. M. em três imagens capturadas em microscopia para cada lamínula. O experimento foi realizado em triplicata *P < 0,5 ** P < 0,05, *** P < 0,001.



6 DISCUSSÃO.

Na elucidação de novos tratamentos para as leishmanioses, as pesquisas que envolvem produtos naturais têm sido bastante promissoras. Os polifenóis derivados de plantas têm demonstrado grande atividade antileishmania contra as diferentes espécies e formas de apresentação do parasita tanto em estudos *in vitro* como *in vivo*, dentre estes componentes encontram-se os stilbenoides, fenilpropanóides, flavonóides e quinonas (DE JESUS et al., 2012). Ogungbe; Erwin; Setzer., (2014) descrevem cerca de 352 compostos fenólicos com atividade antileishmania in-silica sobre alvos proteicos de leishmania, incluindo 10 auronos, seis canabinóides, 34 chalcones, 20 cromenos, 52 cumarinas, 92 flavonóides, 41 isoflavonóides, 52 lignanas, 25 quinonas, oito estilbenoides, nove Xantonas e três compostos fenólicos diversos

Sendo assim, a busca por novos fármacos é com base na descoberta de bioativos e sabe-se que dentre os componentes naturais derivados de plantas existem uma gama de substâncias capazes de agir, isoladas ou em sinergismo com outras, sendo, portanto, necessário determinar quais moléculas estão ativamente exercendo potencial farmacológico.

Dentre alguns compostos fenólicos importantes encontram-se os ácidos gálico e seus dímeros (ácido digálico ou hexaidroxidifênico e ácido elágico). Sendo caracterizados como lactonas fenólicas de ocorrência natural encontradas em *Anacardium occidentale* L., *Myracrodruon urundeuva* Allemão, *Anogeissus leiocarpus* (DC.) Guill. & Perr., *Quercus infectoria* Olivier, *Stryphnodendron obovatum* Benth, por exemplo, na forma de taninos hidrolisáveis chamados elagitaninos (RIBEIRO et al., 2015; KHEIRANDISH et al., 2016; MURAKAMI et al., 1991; VATTEM et al., 2005; SHUAIBU et al., 2008)

O ácido gálico possui propriedades antioxidantes e/ou antiinflamatória (YANG et al., 2015) antimicrobiana (SARJIT et al., 2015), propriedades antimutagênicas e anticarcinogênica (LEE et al., 2003; LU et al., 2010; PAOLINI et al., 2015). Das atividades biológicas comprovadas do ácido elágico destacam-se: anticarcinogênica, hepatoprotetora, inibidora da DNA topoisomerase (VATTEM et al., 2005; AGGARWAL; SHISHODIA, 2006; CORTAZAR; COOMBS; WALKER, 2007), antioxidante (VATTEM et al., 2005; AGGARWAL; SHISHODIA, 2006; CORTAZAR et

al., 2007; DEVIPRIYA; SRINIVASAN; et al., 2007; DEVIPRIYA; SUDHEER; MENON, 2007;), anti-inflamatória (YUCE et al., 2007; PAPOUTSI et al., 2008), gastroproterora (IINO et al., 2001)

Neste estudo, investigou-se o potencial antileishmania, citotóxica bem como os possíveis mecanismos de ação do ácido gálico e do ácido elágico.

O AcG e AcE demonstraram alto potencial de inibição do crescimento de formas promastigotas de *L. major*, após 48 h de incubação, como também apresentando potencial em promover a morte das formas amastigotas axênicas, corroborando com estudos de atividade antileishmania com compostos fenólicos (RIZK et al., 2014). As culturas de amastigotas axênicas foram desenvolvidas para estudos com esta fase do ciclo de vida do parasita, facilitando o screening de novas drogas (DE MUYLDER et al., 2011). Resultados semelhantes de CI_{50} de AcG e AcE como constituintes majoritários de plantas foram encontrados em *Stryphnodendron obovatum* e *Anogeissus leiocarpus*, obtendo valores de $IC_{50} < 30 \mu\text{g/mL}$ (SHUAIBU et al., 2008; RIBEIRO et al., 2015).

AcG alterou notoriamente a morfologia das formas promastigotas após 48 h de incubação, indicando a morte do parasita. Tal alteração foi observada também de forma discreta com o AcE e Anf B. Ao se avaliar a integridade do DNA dos parasitas tratados com AcG e AcE, não observou-se o surgimento de bandas inespecíficas no perfil eletroforético quando comparou-se os grupos tratados com o grupo controle. Segundo Ebrahimisadr et al. (2013), essas bandas poderiam indicar morte celular por degradação do DNA. O AcE é também descrito com potencial inibidor da enzima DNA topoisomerase II sobre formas promastigotas de leishmania, isso nos dá a ideia de possível ação sobre o processo de replicação e/ou de expressão gênica, abrindo perspectivas para novas abordagens (VATTEM et al., 2005; AGGARWAL; SHISHODIA, 2006; CORTAZAR et al., 2007), dentre as espécies estudadas, Corta'zar et al, (2007) descreveram essa atividade sobre promastigotas de *Leishmania panamensis*. Tal enzima tem participação direta na síntese de DNA durante a replicação celular, a inibição dela acarreta no interrompimento da síntese durante a replicação.

Devido à necessidade de obtenção de substâncias com atividade antileishmania que apresentem maior seletividade para o parasita, tornando-as menos tóxicas para as células hospedeiras, o AcG e AcE demonstraram baixos valores de

CI₅₀ sobre ambas as formas de apresentação do parasita, o que nos levou a investigar seus efeitos tóxicos sobre macrófagos. Ambas demonstraram toxicidade significativa sobre essas células, resultando em um valor de CC₅₀ de 126,556 µg/mL para AcG e de 23,811 µg/mL para AcE. Porém, quando comparada com seu valor de CI₅₀ em amastigotas internalizadas, isso indica um índice de seletividade acima de 20 para ambos. A literatura recomenda que, para amastigotas internalizada em macrófagos, este índice deve ser demonstrado como próximo ou superior a 20 (OSORIO et al., 2007). A investigação da ação tóxica de novas alternativas terapêuticas para o enfrentamento das leishmanioses é de suma importância, uma vez que o parasita é intracelular obrigatório (ISLAMUDDIN et al., 2015). Surpreendentemente, o AcG e AcE não demonstraram capacidade hemolítica sobre eritrócitos de carneiro. Essas células, assim como eritrócitos humanos do tipo O+ e os obtidos de sangue de coelho, são utilizadas por não possuir alta expressão de proteínas ou glicoproteínas, que poderiam ser ativadas pelas novas drogas acarretando em uma atividade hemolítica falso positiva, (CARNEIRO et al., 2012).

O modelo experimental de amastigotas internalizadas em macrófagos é o que mais retrata a infecção da forma como ocorre no hospedeiro (CARNEIRO et al., 2012). Dessa forma, as substâncias que são capazes de reduzir a infecção e a infectividade dessas células parasitadas por leishmania são bastante promissoras e relevantes a serem testadas *in vivo*. Nesse estudo observou-se que o AcG e AcE apresentaram alta eficiência em reduzir a infecção e infectividade de macrófagos murinos experimentalmente infectados por *L. major*. Essa capacidade foi dependente da concentração, observando-se melhores resultados na concentração de 60 µg/mL para AcG e 7 µg/mL para AcE em comparação à Anf B. Por microscopia observa-se no grupo controle grande aglomeração de amastigotas em torno do vacúolo parasitóforo. Ao se observar as imagens dos grupos tratados com AcG e AcE observa-se macrófagos com aspecto “esfumeado”. Segundo Kolodziej e Kiderlen; (2005) e Macedo-Silva et al, (2011), esse aspecto remete-se ao fato de que essas células estiveram ativadas e foram capazes de resolver a infecção, não apenas pela capacidade da substância agir sobre o parasita, como também atingindo outras vias que tornam o ambiente intracelular mais hostil. Produtos naturais derivados de plantas são característicos em reduzir a infecção e infectividade de macrófagos acometidos por leishmania, corroborando com este estudo. (CARNEIRO et al., 2012; DE

MEDEIROS et al., 2011; DIAS et al., 2013; DOS SANTOS et al., 2012; RODRIGUES et al., 2013; RODRIGUES et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2017)

Neste estudo foram avaliados parâmetros de ativação de macrófagos com capacidade microbicida (capacidade fagocítica, volume lisossomal, indução da síntese de NO e quantificação de cálcio citoplasmático), que agem em sinergismo para debelar as infecções por leishmania. A dicotomia existente entre resposta imunológica celular do tipo Th1 e Th2 nos hospedeiros acometidos pela doença, leva a investigação de novas alternativas terapêuticas para descoberta de novos fármacos que não apenas tenham atividade sobre o parasita em si, mas também tenha capacidade imunomodulatória para fazer prevalecer a resposta imune do hospedeiro do tipo Th1 (ISLAMUDDIN et al., 2015). As substâncias avaliadas neste estudo (AcG e AcE) obtiveram excelentes resultados de imunomodulação na determinação de capacidade fagocítica e atividade lisossomal que são funções da resposta imunológica inata, importante para o controle de infecções levando a degradação parasitária e apresentação de antígenos via MHC de classe II à células TCD4⁺ (NIEDERGANG; CHAVRIER, 2004). Após a endocitose do parasita ocorre a formação de fagossomos proveniente dos endossomos, seguida da fusão com lisossomos que produzem os fagolisossomos (NIEDERGANG; CHAVRIER, 2004).

O fagolisossoma é um compartimento repleto de hidrolases ácidas e espécies reativas de oxigênio nas quais ocorre a degradação do conteúdo abrangido. Patógenos são assim destruídos dentro do fagolisossoma (LEE et al., 2003; LOPES et al., 2006). Um caminho importante e altamente envolvido no mecanismo da atividade antileishmania é a indução da produção de óxido nítrico (NO) nos macrófagos, sendo o mecanismo mais eficaz envolvido na defesa contra leishmania (GANTT et al., 2001). O NO é sintetizado após a ativação de macrófagos por citocinas, atuando em sinergismo, tais como interferon- γ (IFN- γ) e factor de necrose tumoral alfa (TNF- α), que aumentam a expressão de óxido nítrico sintase, uma enzima que catalisa L-arginina para gerar NO e citrulina (LIEW et al., 1990). Uma vez dentro do fagolisossoma, o NO combina-se com o superóxido para produzir nitrito de peróxido, o qual é altamente reativo e atua como um microbicida (BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1998; UEDA-NAKAMURA et al., 2006). Curiosamente a via de ativação de NO que o AcE induziu nos macrófagos provavelmente foi com a co-estimulação pela presença de formas promastigotas de *L. major*, sendo assim uma alta capacidade

imunomoduladora apenas na presença do patógeno, não alterando a fisiologia da célula. Estes resultados de ativação de macrófagos *in vitro* corroboram com achados na literatura para produtos naturais (KOLODZIEJ; KIDERLEN, 2005; RODRIGUES et al., 2013; ISLAMUDDIN et al., 2015; KHEIRANDISH et al., 2016; RODRIGUES et al., 2015).

Um outro fator extremamente interessante é a presença de cálcio no citoplasma da célula hospedeira. Roy et al, (2014), descreveram um novo mecanismo de evasão e sobrevivência desse parasita no interior hostil dos macrófagos. Tal mecanismo se remete ao aumento da expressão de dois portais envolvendo o cálcio, o PMCA4 que é o portal responsável pelo efluxo de cálcio para o meio extracelular e a SERCA3, responsável pela estocagem de cálcio para o retículo sarcoplasmático. Este mecanismo está continuamente em funcionamento para a homeostase celular, porém com a presença de amastigotas internalizadas ocorre o aumento da expressão de PMCA4 e SERCA3, promovendo a saída de cálcio para o meio extracelular e estocagem do mesmo para o retículo. Além de ser uma molécula microbicida o cálcio intracelular promove a ativação da via clássica da PKC, onde uma vez ativada promove a sinalização de citocinas pró-inflamatórias tais como (TNF- α e IL4), que ao se encontrarem com o linfócito juntamente com o antígeno apresentado por células APC's pelas moléculas de MHC de classe II, ativam os linfócitos T *naive* diferenciando-os em linfócitos TCD4⁺ que por sua vez passam a produzir e liberar INF- γ para ativação de resposta imune celular Th1 (ROY et al., 2014; ISLAMUDDIN et al., 2015;). Uma vez aumentada a expressão de PMCA4 e SERCA3 pela presença do parasita, ocorre a diminuição de cálcio intracelular. Em pouca quantidade ou na ausência de cálcio uma outra via de sinalização é ativada, esta ainda pouco conhecida é através da proteína quinase C zeta (PKC- ζ) (ROY et al., 2014).

Sabe-se que esta via de sinalização promove a expressão de citocinas anti-inflamatórias tais como IL10 e IL12, que ativa os linfócitos T em resposta imunológica celular do tipo Th2, ativando linfócitos B a produzir anticorpos (ROY et al., 2014). Esta resposta Th2 é o que promove a patogenia das leishmanioses nos hospedeiros infectados (ISLAMUDDIN et al., 2015). A ação de novos fármacos sobre a via de aumento de cálcio intracelular está diretamente relacionada a essa via de sinalização.

O AcG e AcE foram capazes de aumentar os níveis de cálcio citoplasmáticos, provavelmente promovendo essa ativação. Radtke et al, (2004); Kolodziej e Kiderlen

(2005); Yadav et al, (2011), descreveram a atividade imunomodulatória de compostos fenólicos, dentre eles o AcG, capazes de promover o aumento da síntese de NO, bem como o aumento da expressão de genes resultantes da produção de citocinas pró-inflamatórias, tais como TNF- α e INF- γ .

Miltefosina é um dos fármacos convencionais amplamente utilizado no continente africano e Europa como o único a ser administrado por via oral para o combate às leishmanioses e, mais recentemente, no Brasil autorizado e comercializado para tratamento da leishmaniose visceral canina (VERMA; DEY, 2004; ROATT et al., 2014). Seu mecanismo de ação é descrito por Verma e Dey (2004) pela atividade imunomoduladora através do metabolismo do inositol, ativação da fosfolipase e proteína quinase C. Este estudo revela que o AcG e AcE muito provavelmente agem também por vias semelhantes, sendo portanto, moléculas bastante promissoras para o possível tratamento das leishmanioses.

Este estudo é o primeiro a descrever substâncias fenólicas indutoras de aumento de cálcio citoplasmático como mecanismo de ativação de macrófagos que resulta na via de sinalização para direcionar resposta imune do tipo Th1 o que sugere que o tratamento com AcG e AcE induzem uma resposta Th1.

7 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

AcG e AcE foram capazes de apresentar grande potencial antileishmania sobre formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. major*, de reduzir a infecção e infectividade de macrófagos parasitados, atuando também através de vias de ativação de macrófagos, tais como aumento da capacidade fagocitária, aumento do volume lisossomal, aumento da síntese de NO e de cálcio citoplasmático.

Investigações futuras serão realizadas para avaliar o efeito terapêutico do AcG e AcE veiculado em microemulsões e outras formulações farmacêuticas, para tratamento da úlcera leishmaniótica provocada por *L. major* no modelo murino, bem como avaliar a resposta imune do hospedeiro e proliferação de células T durante e após o tratamento.

9 REFERÊNCIAS.

AGGARWAL, B. B.; SHISHODIA, S. Molecular targets of dietary agents for prevention and therapy of cancer. **Biochem Pharmacol**, v. 71, n. 10, p. 1397-421, May 14 2006.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. Leishmania species: models of intracellular parasitism. **J Cell Sci**, v. 112 Pt 18, p. 2993-3002, Sep 1999.

ALIZADEH, B. H. et al. Leishmanicidal evaluation of novel synthetic chromenes. **Arch Pharm (Weinheim)**, v. 341, n. 12, p. 787-93, Dec 2008.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clin Exp Dermatol**, v. 35, n. 7, p. 699-705, Oct 2010.

ANTINORI, S.; SCHIFANELLA, L.; CORBELLINO, M. Leishmaniasis: new insights from an old and neglected disease. **Eur J Clin Microbiol Infect Dis**, v. 31, n. 2, p. 109-18, Feb 2012.

ASHFORD, R. W. The leishmaniasis as emerging and reemerging zoonoses. **Int J Parasitol**, v. 30, n. 12-13, p. 1269-81, Nov 2000.

BADARÓ, R.; SCHOOLEY, R. T. Environmental and human leishmaniasis risk factors. Update of American Trypanosomiasis and Leishmaniasis. Control and Research: final report, Pan American Health Organization/ World Health Organization (PAHO/WHO). **Sociedade pediátrica do Rio de Janeiro (SOPERJ)**, p. 111-169, 2008.

BADKE, M. R. et al. Plantas medicinais: o saber sustentado na prática do cotidiano popular. **Escola Anna Nery**, v.15, n.1, p. 9-132, 2011.

BERMAN, J. Clinical status of agents being developed for leishmaniasis. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 14, n. 11, p. 1337-46, Nov 2005.

BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. The immune response to Leishmania: mechanisms of parasite control and evasion. **Int J Parasitol**, v. 28, n. 1, p. 121-34, Jan 1998.

BONATTO, S. J. et al. Lifelong exposure to dietary fish oil alters macrophage responses in Walker 256 tumor-bearing rats. **Cell Immunol**, v. 231, n. 1-2, p. 56-62, Sep-Oct 2004.

BRASIL. Ministério da Saúde . Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de**

Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana. Série A. Normas e Manuais Técnicos. 2. Ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2010.

CALIXTO, J. B. Efficacy, safety, quality control, marketing and regulatory guidelines for herbal medicines (phytotherapeutic agents). **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 33, p. 179-189, 2000.

CARNEIRO, S. M. et al. The cytotoxic and antileishmanial activity of extracts and fractions of leaves and fruits of *Azadirachta indica* (A Juss.). **Biol Res**, v. 45, n. 2, p. 111-6, 2012.

CHAWLA, A.; NGUYEN, K. D.; GOH, Y. P. Macrophage-mediated inflammation in metabolic disease. **Nat Rev Immunol**, v. 11, n. 11, p. 738-49, Oct 10 2011.

CHOI, C. M.; LERNER, E. A. Leishmaniasis as an emerging infection. **J Investig Dermatol Symp Proc**, v. 6, n. 3, p. 175-82, Dec 2001.

CLARK, R. A. et al. The vast majority of CLA⁺ T cells are resident in normal skin. **J Immunol**, v. 176, n. 7, p. 4431-9, Apr 01 2006.

COLOTTI, G.; ILARI, A. Polyamine metabolism in *Leishmania*: from arginine to trypanothione. **Amino Acids**, v. 40, n. 2, p. 269-85, Feb 2011.

CORTAZAR, T. M.; COOMBS, G. H.; WALKER, J. *Leishmania panamensis*: comparative inhibition of nuclear DNA topoisomerase II enzymes from promastigotes and human macrophages reveals anti-parasite selectivity of fluoroquinolones, flavonoids and pentamidine. **Exp Parasitol**, v. 116, n. 4, p. 475-82, Aug 2007.

CROFT, S. L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy--challenges and opportunities. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 10, p. 1478-83, Oct 2011.

DE JESUS, N. Z. et al. Tannins, peptic ulcers and related mechanisms. **Int J Mol Sci**, v. 13, n. 3, p. 3203-28, 2012.

- DE LIMA DAVID, J. P.; NASCIMENTO, J. A. P.; DAVID, J. M. Produtos fitoterápicos: uma perspectiva de negócio para a indústria, um campo pouco explorado pelos farmacêuticos. **Infarma-Ciências Farmacêuticas**, v. 16, n. 9, p. 71-76, 2013.
- DE MACEDO-SILVA, S. T. et al. Antiproliferative, Ultrastructural, and Physiological Effects of Amiodarone on Promastigote and Amastigote Forms of *Leishmania amazonensis*. **Mol Biol Int**, v. 2011, p. 876021, 2011.
- DE MEDEIROS, M. et al. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. **Parasitol Int**, v. 60, n. 3, p. 237-41, Sep 2011.
- DE MUYLDER, G. et al. A screen against *Leishmania* intracellular amastigotes: comparison to a promastigote screen and identification of a host cell-specific hit. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 5, n. 7, p. e1253, Jul 2011.
- DECUYPERE, S. et al. Molecular mechanisms of drug resistance in natural *Leishmania* populations vary with genetic background. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 2, p. e1514, 2012.
- DEN BOER, M. et al. Leishmaniasis impact and treatment access. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 10, p. 1471-7, Oct 2011.
- DEVIPRIYA, N. et al. Effect of ellagic acid, a natural polyphenol, on alcohol-induced prooxidant and antioxidant imbalance: a drug dose dependent study. **Singapore Med J**, v. 48, n. 4, p. 311-8, Apr 2007.
- DEVIPRIYA, N.; SUDHEER, A. R.; MENON, V. P. Dose-response effect of ellagic acid on circulatory antioxidants and lipids during alcohol-induced toxicity in experimental rats. **Fundam Clin Pharmacol**, v. 21, n. 6, p. 621-30, Dec 2007.
- DIAS, C. N. et al. Molluscicidal and leishmanicidal activity of the leaf essential oil of *Syzygium cumini* (L.) SKEELS from Brazil. **Chem Biodivers**, v. 10, n. 6, p. 1133-41, Jun 2013.
- DI GIORGIO, C., et al. In vitro antileishmanial activity of diphyllin isolated from *Haplophyllum bucharicum*. **Planta Med**. n. 71, p. 366–369 2005.
- DOS SANTOS, K. K. et al. Cytotoxic, trypanocidal, and antifungal activities of *Eugenia jambolana* L. **J Med Food**, v. 15, n. 1, p. 66-70, Jan 2012.

DNDi - **Drugs for Neglected Diseases initiative** (DNDi), 2011. Disponível em <<http://www.dndi.org/diseases-projects/diseases/vl/global-view.html>> acesso em 2015.

EBRAHIMISADR, P.; GHAFARIFAR, F.; MOHAMMAD HASSAN, Z. In-vitro Evaluation of Antileishmanial Activity and Toxicity of Artemether with Focus on its Apoptotic Effect. **Iran J Pharm Res**, v. 12, n. 4, p. 903-9, Fall 2013.

FLORES ECHEVERRÍA, K. M. **Ensayo de control y dinámicapoblacional de flebótomos vectores de leishmaniasis visceral, a través del uso de mosquiteros impregnados condeltametrina**. Tese. En San Mateo, Municipio Bolívar, Estado Aragua, Venezuela. 2013.

GANTT, K. R. et al. Oxidative responses of human and murine macrophages during phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **J Immunol**, v. 167, n. 2, p. 893-901, Jul 15 2001.

GODINHO, J. L. et al. Efficacy of miltefosine treatment in *Leishmania amazonensis*-infected BALB/c mice. **Int J Antimicrob Agents**, v. 39, n. 4, p. 326-31, Apr 2012.

GRANDO, F. C. et al. Modulation of peritoneal macrophage activity by the saturation state of the fatty acid moiety of phosphatidylcholine. **Braz J Med Biol Res**, v. 42, n. 7, p. 599-605, Jul 2009.

IINO, T. et al. Less damaging effect of whisky in rat stomachs in comparison with pure ethanol. Role of ellagic acid, the nonalcoholic component. **Digestion**, v. 64, n. 4, p. 214-21, 2001.

ISLAMUDDIN, M. et al. Th1-biased immunomodulation and therapeutic potential of *Artemisia annua* in murine visceral leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, n. 1, p. e3321, Jan 2015.

ISERHARD A. R. M. et al.. Práticas culturais de cuidados de mulheres mães de recém-nascido de risco do Sul do Brasil. **Escola Anna Nery**, v. 13, n. 1, p.22- 116, 2009

ITO, H. Metabolites of the ellagitannin geraniin and their antioxidant activities. **Planta Med**, v. 77, n. 11, p. 1110-5, Jul 2011.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nat Rev Microbiol**, v. 9, n. 8, p. 604-15, Jul 11 2011.

KHEIRANDISH, F. et al. Antileishmanial, antioxidant, and cytotoxic activities of *Quercus infectoria* Olivier extract. **Biomed Pharmacother**, v. 82, p. 208-15, Aug 2016.

KOLODZIEJ, H.; KIDERLEN, A. F. Antileishmanial activity and immune modulatory effects of tannins and related compounds on *Leishmania* parasitised RAW 264.7 cells. **Phytochemistry**, v. 66, n. 17, p. 2056-71, Sep 2005.

KONDRASHIN, A. V. et al. [Global trends in malaria control. Progress and topical tasks in malaria control programs]. **Med Parazitol (Mosk)**, n. 4, p. 3-8, Oct-Dec 2011.

LEE, W. L.; HARRISON, R. E.; GRINSTEIN, S. Phagocytosis by neutrophils. **Microbes Infect**, v. 5, n. 14, p. 1299-306, Nov 2003.

LIEW, F. Y. et al. Macrophage killing of *Leishmania* parasite in vivo is mediated by nitric oxide from L-arginine. **J Immunol**, v. 144, n. 12, p. 4794-7, Jun 15 1990.

LINDOSO, J. A. et al. Visceral leishmaniasis and HIV coinfection in Latin America. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 8, n. 9, p. e3136, Sep 2014.

LOFGREN, S. E. et al. Trypanocidal and leishmanicidal activities of different antimicrobial peptides (AMPs) isolated from aquatic animals. **Exp Parasitol**, v. 118, n. 2, p. 197-202, Feb 2008.

LOPES, L. et al. Phagocytosis, endosomal/lysosomal system and other cellular aspects of macrophage activation by Canova medication. **Micron**, v. 37, n. 3, p. 277-87, 2006.

LU, Y. et al. Gallic acid suppresses cell viability, proliferation, invasion and angiogenesis in human glioma cells. **Eur J Pharmacol**, v. 641, n. 2-3, p. 102-7, Sep 1 2010.

LUQUE-ORTEGA, J. R.; RIVAS, L. Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome c oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 51, n. 4, p. 1327-32, Apr 2007.

MAAROUF, M. et al. Biochemical alterations in paromomycin-treated *Leishmania donovani* promastigotes. **Parasitol Res**, v. 83, n. 2, p. 198-202, 1997.

MACHADO, M. et al. Monoterpenic aldehydes as potential anti-*Leishmania* agents: activity of *Cymbopogon citratus* and citral on *L. infantum*, *L. tropica* and *L. major*. **Exp Parasitol**, v. 130, n. 3, p. 223-31, Mar 2012.

MAIA, C. S. The perception of the risk factors associated with American Visceral Leishmaniasis in Petrolina, Pernambuco, Brazil. **Medicina Veterinária**, v. 7, n. 4, p. 19-25, 2013.

MISHRA, P.K. et al. Glycolipids and other constituents from *Desmodium gangeticum* with antileishmanial and immunomodulatory activities. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, v. 15, n. 20, p. 46- 4543, 2005.

MITROPOULOS, P.; KONIDAS, P.; DURKIN-KONIDAS, M. New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. **J Am Acad Dermatol**, v. 63, n. 2, p. 309-22, Aug 2010.

MONTALVO, A. M. et al. [Leishmaniasis diagnosis: going from microscopic observation of parasite to DNA detection]. **Rev Cubana Med Trop**, v. 64, n. 2, p. 108-31, May-Aug 2012.

MORAIS-BRAGA, M. F. B. et al. Citotocidade e atividade antiparasitária de *Lygodium venustum* SW. **Acta Toxicológica Argentina**, v. 21, n. 1, p. 50-56, 2013.

MOREIRA, W.; LEBLANC, E.; OUELLETTE, M. The role of reduced pterins in resistance to reactive oxygen and nitrogen intermediates in the protozoan parasite *Leishmania*. **Free Radic Biol Med**, v. 46, n. 3, p. 367-75, Feb 01 2009.

MURAKAMI, S. et al. Inhibition of gastric H⁺, K(+) -ATPase and acid secretion by ellagic acid. **Planta Med**, v. 57, n. 4, p. 305-8, Aug 1991.

NATERA, S. et al. *Leishmania* spp.: proficiency of drug-resistant parasites. **Int J Antimicrob Agents**, v. 29, n. 6, p. 637-42, Jun 2007.

NEVES, D. B.; CALDAS, E. D.; SAMPAIO, R. N. Antimony in plasma and skin of patients with cutaneous leishmaniasis--relationship with side effects after treatment with meglumine antimoniate. **Trop Med Int Health**, v. 14, n. 12, p. 1515-22, Dec 2009.

NIEDERGANG, F.; CHAVRIER, P. Signaling and membrane dynamics during phagocytosis: many roads lead to the phagos(R)ome. **Curr Opin Cell Biol**, v. 16, n. 4, p. 422-8, Aug 2004.

OGUNGBE, I. V.; ERWIN, W. R.; SETZER, W. N. Antileishmanial phytochemical phenolics: molecular docking to potential protein targets. **J Mol Graph Model**, v. 48, p. 105-17, Mar 2014.

OLIVEIRA, V. C. et al. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. **Parasitol Res**, v. 104, n. 5, p. 1053-9, Apr 2009.

OLIVEIRA, L. G. C. et al. *In vitro* effects of the Neolignan 2,3-Dihydrobenzofuran against *Leishmania amazonensis*. **Basic & Clin Pharm & Toxicol**, v. 01, n.01 p. 1-7, Jan 2017.

OSORIO, E. et al. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. **J Ethnopharmacol**, v. 111, n. 3, p. 630-5, May 22 2007.

PAOLINI, A. et al. Gallic acid exerts a protective or an anti-proliferative effect on glioma T98G cells via dose-dependent epigenetic regulation mediated by miRNAs. **Int J Oncol**, v. 46, n. 4, p. 1491-7, Apr 2015.

PAPOUTSI, Z. et al. Walnut extract (*Juglans regia* L.) and its component ellagic acid exhibit anti-inflammatory activity in human aorta endothelial cells and osteoblastic activity in the cell line KS483. **Br J Nutr**, v. 99, n. 4, p. 715-22, Apr 2008.

PATIL, J. R. et al. Bioactive compounds from mexican lime (*Citrus aurantifolia*) juice induce apoptosis in human pancreatic cells, **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 57, n. 22, p. 10933–10942, 2010.

PIRES A. M. S. et al. Aspectos Imunológicos e Clínicos da Leishmaniose Tegumentar Americana: UMA REVISÃO. **Revista Ciências da Saúde**, v. 14, n. 1, p. 30-39, 2012.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicol**, v. 39, n. 5, p. 603-13, 2001

RADTKE, O. A. et al. Gene expression profiles of inducible nitric oxide synthase and cytokines in *Leishmania major*-infected macrophage-like RAW 264.7 cells treated with gallic acid. **Planta Med**, v. 70, n. 10, p. 924-8, Oct 2004.

RAMESH BABU, J. et al. Genetic inactivation of p62 leads to accumulation of hyperphosphorylated tau and neurodegeneration. **J Neurochem**, v. 106, n. 1, p. 107-20, Jul 2008.

RATHI, S. K. et al. Therapeutic trial of sodium antimony gluconate alone and in combination with ketoconazole in post-kala-azar dermal leishmaniasis. **Indian J Dermatol Venereol Leprol**, v. 69, n. 6, p. 392-3, Nov-Dec 2003.

REITHINGER, R.; COLEMAN, P. G. Treating cutaneous leishmaniasis patients in Kabul, Afghanistan: cost-effectiveness of an operational program in a complex emergency setting. **BMC Infect Dis**, v. 7, p. 3, Jan 30 2007.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis**, v. 7, n. 9, p. 581-96, Sep 2007.

RIBEIRO, T. G. et al. Antileishmanial activity of standardized fractions of *Stryphnodendron obovatum* (Barbatimao) extract and constituent compounds. **J Ethnopharmacol**, v. 165, p. 238-42, May 13 2015.

RIZK, Y. S. et al. In vitro activity of the hydroethanolic extract and biflavonoids isolated from *Selaginella sellowii* on *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 8, p. 1050-6, Dec 2014.

ROATT, B. M. et al. Immunotherapy and Immunochemotherapy in Visceral Leishmaniasis: Promising Treatments for this Neglected Disease. **Front Immunol**, v. 5, p. 272, 2014.

RODRIGUES A. G.; SANTOS M. G.; AMARAL A. C. F. **Políticas públicas em plantas medicinais e fitoterápicos**. Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Departamento de Assistência Farmacêutica. A fitoterapia no SUS e o programa de pesquisas de plantas medicinais da central de medicamentos. Brasília, Ministério da Saúde (BR), 2006.

RODRIGUES, K. A. et al. *Eugenia uniflora* L. Essential Oil as a Potential Anti-*Leishmania* Agent: Effects on *Leishmania amazonensis* and Possible Mechanisms of Action. **Evid Based Complement Alternat Med**, v. 2013, p. 279726, 2013.

RODRIGUES, K. A. et al. *Syzygium cumini* (L.) Skeels essential oil and its major constituent alpha-pinene exhibit anti-*Leishmania* activity through immunomodulation in vitro. **J Ethnopharmacol**, v. 160, p. 32-40, Feb 3 2015.

ROSTAMI, N. S. et al. CD8+ T cells as a source of IFN- γ production in human cutaneous leishmaniasis. **PLOS Neglected tropical diseases**, v. 4, n. 10, 2010.

ROSYPAL, A. C.; ZAJAC, A. M.; LINDSAY, D. S. Canine visceral leishmaniasis and its emergence in the United States. **Vet Clin North Am Small Anim Pract**, v. 33, n. 4, p. 921-37, viii, Jul 2003.

ROY, N. et al. Regulation of PKC mediated signaling by calcium during visceral leishmaniasis. **PLoS One**, v. 9, n. 10, p. e110843, 2014.

SANTA-RITA, R. M. et al. Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. **J Antimicrob Chemother**, v. 54, n. 4, p. 704-10, Oct 2004.

SANTIN, M. R. et al. In vitro activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*. **Parasitol Res**, v. 105, n. 6, p. 1489-96, Nov 2009.

SANTOS, A. O. et al. Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*. **J Ethnopharmacol**, v. 120, n. 2, p. 204-8, Nov 20 2008.

SARJIT, A.; WANG, Y.; DYKES, G. A. Antimicrobial activity of gallic acid against thermophilic *Campylobacter* is strain specific and associated with a loss of calcium ions. **Food Microbiol**, v. 46, p. 227-33, Apr 2015.

SCHENKEL, G.P. **Cuidados com os medicamentos**. 4 ed. Santa Catarina, 2004.

SHUAIBU, M. N. et al. Castalagin from *Anogeissus leiocarpus* mediates the killing of *Leishmania* in vitro. **Parasitol Res**, v. 103, n. 6, p. 1333-8, Nov 2008.

SINGH, S.; SIVAKUMAR, R. Recent advances in the diagnosis of leishmaniasis. **J Postgrad Med**, v. 49, n. 1, p. 55-60, Jan-Mar 2003.

SILVA, R. A. O. et al. Prospecção tecnológica de fitoterápico (euphorbiatirucalli I.) utilizado no tratamento de neoplasias e outras doenças. **Cadernos de Prospecção**, v. 6, n. 4, p. 490, 2014.

SIMÕES, C. M. O. et al. **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. 6. Ed. Porto Alegre- Florianopolis. Editora da Universidade. UFRGS, 2002.

SIMÕES, C.M.O. et al. **Farmacognosia da Planta ao Medicamento**, 5th ed.; Editora da UFRGS: Porto Alegre, Brasil, 2003.

SINHA, S.; NATH, R.; SANTOS, L. Trapped two-dimensional condensates with synthetic spin-orbit coupling. **Phys Rev Lett**, v. 107, n. 27, p. 270401, Dec 30 2011.

SIQUEIRA-NETO, J. L. et al. Antileishmanial high-throughput drug screening reveals drug candidates with new scaffolds. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 4, n. 5, p. e675, May 04 2010.

SOARES, D. C. et al. Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*. **Parasitol Int**, v. 56, n. 2, p. 135-9, Jun 2007.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 17, n. 5, p. 787-94, May 2008.

UEDA-NAKAMURA, T. et al. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitol Int**, v. 55, n. 2, p. 99-105, Jun 2006.

VALADARES, D. G. et al. Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species. **Parasitol Int**, v. 60, n. 4, p. 357-63, Dec 2011.

VATTEM, D. A.; GHAEDIAN, R.; SHETTY, K. Enhancing health benefits of berries through phenolic antioxidant enrichment: focus on cranberry. **Asia Pac J Clin Nutr**, v. 14, n. 2, p. 120-30, 2005.

VEIGA JUNIOR, V. F. Estudo do consumo de plantas medicinais na Região Centro-Norte do Rio de Janeiro: aceitação pelos profissionais de saúde e modo de uso pela população. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.18, n. 2, p. 308-313, 2008.

VERMA, N. K.; DEY, C. S. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 48, n. 8, p. 3010-5, Aug 2004.

VINCENDEAU, P. et al. Arginases in parasitic diseases. **Trends Parasitol**, v. 19, n. 1, p. 9-12, Jan 2003.

WALDRON, L. S. et al. Molecular epidemiology and spatial distribution of a waterborne cryptosporidiosis outbreak in Australia. **Appl Environ Microbiol**, v. 77, n. 21, p. 7766-71, Nov 2011.

WHO, 2010. First WHO report on neglected tropical diseases. Disponível em http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564090_eng.pdf >acesso em 2015

YADAV, D. K.; KHAN, F.; NEGI, A. S. Pharmacophore modeling, molecular docking, QSAR, and in silico ADMET studies of gallic acid derivatives for immunomodulatory activity. **J Mol Model**, v. 18, n. 6, p. 2513-25, Jun 2012.

YANG, Y. H. et al. Protective effects of gallic acid against spinal cord injury-induced oxidative stress. **Mol Med Rep**, v. 12, n. 2, p. 3017-24, Aug 2015.

YUCE, A. et al. Ellagic acid prevents cisplatin-induced oxidative stress in liver and heart tissue of rats. **Basic Clin Pharmacol Toxicol**, v. 101, n. 5, p. 345-9, Nov 2007.