



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PRODUTOS
NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS



PATRÍCIA NÉRIS ANDRADE

**ESTUDOS *in vitro* E *in vivo* DA ATIVIDADE DA NEOLIGNANA
LICARINA A LIVRE OU ASSOCIADA AO ÁCIDO ASCÓRBICO SOBRE
Leishmania (Leishmania) amazonensis SENSÍVEL E RESISTENTE AO
ANTIMONIAL TRIVALENTE**

João Pessoa – PB

2017

PATRÍCIA NÉRIS ANDRADE

**ESTUDOS *in vitro* E *in vivo* DA ATIVIDADE DA NEOLIGNANA
LICARINA A LIVRE OU ASSOCIADA AO ÁCIDO ASCÓRBICO SOBRE
Leishmania (Leishmania) amazonensis SENSÍVEL E RESISTENTE AO
ANTIMONIAL TRIVALENTE**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito final para obtenção do título de DOUTOR em PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS – Área de concentração: FARMACOLOGIA.

Orientadoras: Profa. Dra. Márcia Rosa de Oliveira

Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas

João Pessoa – PB

2017

A553e Andrade, Patrícia Nérís.

Estudos in vitro e in vivo da atividade da neolignana licarina a livre ou associada ao ácido ascórbico sobre leishmania (leishmania) amazonensis sensível e resistente ao antimonial trivalente / Patrícia Nérís Andrade. - João Pessoa, 2017.

167 f. : il.

Orientação: Sandra Rodrigues Mascarenhas.

Coorientação: Márcia Rosa de Oliveira.

Tese (Doutorado) - UFPB/CCS.

1. Produtos naturais. 2. Atividade antileishmania. 3. Neolignana. 4. Licarina A. I. Mascarenhas, Sandra Rodrigues. II. Oliveira, Márcia Rosa de. III. Título.

UFPB/BC

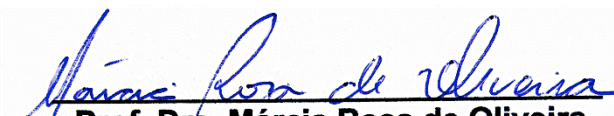
PATRÍCIA NÉRIS ANDRADE

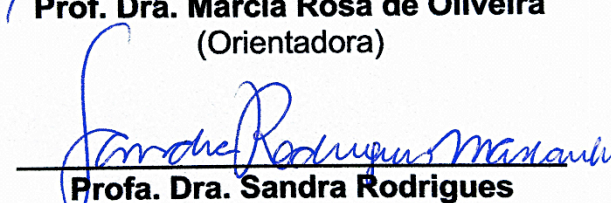
**ESTUDOS *in vitro* E *in vivo* DA ATIVIDADE DA NEOLIGNANA
LICARINA A LIVRE OU ASSOCIADA AO ÁCIDO ASCÓRBICO SOBRE
Leishmania (Leishmania) amazonensis SENSÍVEL E RESISTENTE AO
ANTIMONIAL TRIVALENTE**

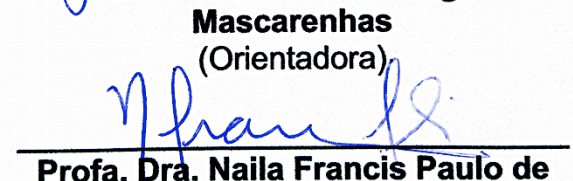
Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos do Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal da Paraíba, como requisito final para obtenção do título de DOUTOR em PRODUTOS NATURAIS E SINTÉTICOS BIOATIVOS – Área de concentração: FARMACOLOGIA.

Data da aprovação ____/____/____

Banca Examinadora


Prof. Dra. Márcia Rosa de Oliveira
(Orientadora)


Prof. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas
(Orientadora)


Prof. Dra. Naila Francis Paulo de Oliveira
(Membro Externo)

Prof. Dra. Louisa Maria de Andrade e Sousa
(Membro Externo)

Prof. Dra. Márcia Regina Piuvezam
(Membro Interno)

Prof. Dra. Marianna Vieira Sobral
(Membro Interno)

Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe
(Membro Suplente Externo)

Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro
(Membro Suplente Interno)

A minha família,
Especialmente a Felipe e meus filhos.
Dedico.

AGRADECIMENTOS

A meus pais, Gilberto e Marilene, pelo amor, incentivo e por todos os ensinamentos de vida: por ensinar-me a agir com dignidade, honestidade e respeito, e aos meus irmãos, Gilberto Jr. e Priscilla, pelo apoio, amizade, e por fazerem minha vida mais leve e alegre.

Ao meu esposo Felipe, pelo amor, carinho, amizade e companheirismo, por me fazer sorrir sempre que preciso, pelo apoio incondicional em tudo e em todos os momentos da minha vida. Você é e sempre será fundamental para todas as minhas conquistas. Obrigada por tudo e por me dar os meus bens mais preciosos, os meus filhos, que são a fonte da minha força para superar todos os obstáculos.

À minha orientadora, Prof. Dra. Márcia Rosa de Oliveira, pelo exemplo de professora e pesquisadora, obrigada por sempre confiar em mim, pela amizade construída, pelos ensinamentos adquiridos, e por guiar-me durante minha formação acadêmica, desde a graduação até a pós-graduação. Foi um longo caminho, sendo só possível concluir devido ao seu apoio e compreensão nos momentos em que mais precisei. Muito obrigada.

À Profa. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas, por ter aceitado prontamente em contribuir com este trabalho e por todo o seu incentivo durante a minha pesquisa. A todos os alunos do Laboratório de Imunofarmacologia/CBiotec, em especial à Luiz e Guilherme pelo auxílio nos experimentos de ELISA;

A todos do Laboratório de Leishmanioses que fizeram parte dessa caminhada, Klinger, Laísa, Juliana, Cínthia, Mayara, Vanessa e Daiana. Obrigada por toda ajuda nos experimentos, pelas alegrias e brincadeiras, pelas risadas, e especialmente, pela amizade construída ao longo desses anos. Todo o meu doutorado não seria possível sem a contribuição de cada um de vocês.

Ao Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues, pela síntese da Licarina A, e por todos os ensinamentos com relação à síntese química;

Ao Prof. Dr. Luis Fernando Marques, pela colaboração nos ensaios de atividade de transportadores ABC e por toda paciência em me introduzir nesse tema fascinante.

À Profa. Dra. Naila Francis Paulo de Oliveira, pela colaboração no ensaio de metilação global de *Leishmania* e por toda discussão acerca do tema.

À Profa. Dra. Giciane Carvalho Vieira, pela colaboração no estudo histológico do experimento *in vivo*, e em especial a sua aluna Raquel por todo auxílio nos experimentos.

À Profa. Dra. Marianna Viera Sobral e a sua equipe do Laboratório de Oncofarmacologia, especialmente à Tatyanna Kélvia e Vivianne Mendes, pela colaboração nos ensaios de toxicidade *in vivo*;

Aos professores membros da banca examinadora Prof^a. Dra. Márcia Regina Piuvezam, Prof^a. Dra. Marianna Vieira Sobral, Prof^a. Dra. Naila Francis Paulo de Oliveira, Prof^a. Dra. Louisa Maria de Andrade Sousa, Prof. Dr. Cícero Francisco Bezerra Felipe e Prof. Dr. Ricardo Dias de Castro pela disponibilização em contribuir para o enriquecimento deste trabalho.

À nossa técnica de laboratório, dona Rosângela, pela amizade construída durante esses longos anos no Laboratório de Leishmaniose e por toda a ajuda no funcionamento do nosso laboratório. E aos demais técnicos do Departamento de Biologia Molecular, Alda e Bosco, por todo auxílio.

Aos colegas de Pós-Graduação do PPgPNSB, pela boa convivência e por tornarem os momentos difíceis em algo agradável;

Ao programa de em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, em especial a todos os professores pela contribuição na minha formação.

À Crispim, do Biotério Thomas George (IpeFarM/UFPB), pela amizade e apoio com os animais.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pela concessão da bolsa de doutorado.

Por fim, o mais importante agradecimento a Deus, por ter permitido a realização de mais uma etapa de minha vida, assim como por ter colocado em meu caminho todas essas pessoas maravilhosas que auxiliaram em meu desenvolvimento.

RESUMO

ANDRADE, P.N. **ESTUDOS *in vitro* E *in vivo* DA ATIVIDADE DA NEOLIGNANA LICARINA A LIVRE OU ASSOCIADA AO ÁCIDO ASCÓRBICO SOBRE *Leishmania (Leishmania) amazonensis* SENSÍVEL E RESISTENTE AO ANTIMONIAL TRIVALENTE.** 2017. 167f. **Tese** – Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (CCS/UFPB), João Pessoa – PB.

As drogas disponíveis para o tratamento das leishmanioses são geralmente tóxicas. No Brasil, o tratamento dessas doenças é realizado principalmente pela administração parenteral do antimonial pentavalente Glucantime[®], utilizado como droga de primeira escolha. Todavia, a terapêutica com este medicamento, além de apresentar sérios efeitos colaterais, comumente apresenta falhas devido à frequente seleção de parasitos *Leishmania* spp. resistentes aos antimoniais. Portanto torna-se necessária a busca por moléculas bioativas que sejam efetivas contra os parasitos, sem apresentarem toxicidade significativa para humanos. Neste contexto, esse trabalho teve como objetivo avaliar a atividade antileishmania da neolignana licarina A em modelos experimentais *in vitro* e *in vivo*. A licarina A apresentou atividade antileishmania *in vitro* sobre formas promastigotas (CI₅₀ de 22,13 µg/mL), amastigotas axênicas (CE₅₀ de 10,78 µg/mL) e amastigotas intracelulares (CE₅₀/72h de 5,68 µg/mL) de *Leishmania (L.) amazonensis*. A sua ação sobre macrófagos infectados foi associada a uma atividade imunoloduladora devido ao aumento nos níveis de Interleucina (IL)-12 e óxido nítrico (NO), sendo esse aumento de 15,2% ($p \leq 0,05$) e 120,34% ($p \leq 0,05$) respectivamente, além de diminuição dos níveis de IL-6 e IL-10 em 51,5% ($p \leq 0,05$) e 42,78% ($p \leq 0,05$), respectivamente, após tratamento com 15 µg/mL da licarina A por 72h. Verificou-se que a licarina A também foi efetiva sobre parasitos de *L. (L.) amazonensis* resistente ao antimonial trivalente (Sb^{III}). Embora esses parasitos resistentes ao antimônio tenham apresentado uma maior virulência do que a correspondente cultura sensível, tanto em modelos de infecção *in vitro* como *in vivo*, a licarina A foi igualmente efetiva sobre ambas as culturas. Observou-se também que camundongos Swiss infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com a licarina A e o ácido ascórbico apresentaram uma redução significativa de 40,78% ($p \leq 0,05$) no tamanho de lesão a partir da quarta semana de tratamento, bem como redução na carga parasitária do linfonodo e baço destes animais. Adicionalmente, a histoarquitetura da pata dos animais tratados foi parcialmente restaurada, observando-se reorganização das fibras colágenas, diminuição do edema e do infiltrado celular na derme, hipoderme e entre as fibras musculares. Esse resultado foi também associado a uma resposta imunomoduladora, devido a um aumento na produção de Interferon (IF)- γ de 266,7% ($p \leq 0,001$) pelas células dos linfonodos dos animais tratados. Verificou-se que o co-tratamento com licarina A e ácido ascórbico não apresentou toxicidade significativa, visto que os animais não apresentaram alteração no peso, na pelagem, nem nos parâmetros bioquímicos e hematológicos analisados. Assim, conclui-se que a licarina A apresenta expressiva atividade antileishmania em modelo murino, sendo uma molécula promissora a ser melhor investigada na busca por novos tratamentos para as leishmanioses.

Palavras-chave: Licarina A, *L. (L.) amazonensis*, atividade antileishmania

ABSTRACT

ANDRADE, P. N. ***In vitro* AND *in vivo* STUDIES OF NEOLIGNAN LICARIN A ACTIVITY FREE OR ASSOCIATED WITH ASCORBIC ACID IN *Leishmania (Leishmania) amazonensis* SENSITIVE AND RESISTANT TO THE TRIVALENT ANTIMONIAL.** 2017. 167f. **Thesis** – Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (CCS/UFPB), João Pessoa – PB.

The drugs available for the treatment of leishmaniasis are usually very toxic. In Brazil, the treatment of these diseases is mainly performed by parenteral administration of pentavalent antimony Glucantime[®], used as the first choice drug. However, therapy with this drug is associated with serious side effects and often presents failure due to the selection of *Leishmania* sp. resistant to antimonials. Therefore, researches aiming the search for bioactive molecules that are effective against the parasites, without significant toxicity to humans, are necessary. In this context, this work aimed to evaluate the antileishmanial activity of the neolignan Licarin A in experimental models *in vitro* and *in vivo*. Licarin A showed *in vitro* antileishmanial activity on promastigotes (IC₅₀ of 22.13 µg/mL), axenic amastigotes (EC₅₀ of 10.78 µg/mL) and intracellular amastigotes (EC₅₀/72h of 5.68 µg/mL) forms of *Leishmania (L.) amazonensis*. Its action on infected macrophages was associated with immunomodulatory activity by increasing the levels of interleukin (IL)-12 and nitric oxide (NO) in 15.2% ($p \leq 0.05$) and 120.34% ($p \leq 0.05$), respectively, and reduction in the level of IL-6 and IL-10 in 51.5% ($p \leq 0.05$) and 42.78% ($p \leq 0.05$), respectively, after treatment with the concentration of 15 µg/mL of Licarin A for 72h. It was found that licarin A was also effective on parasites of *L. (L.) amazonensis* resistant to trivalent antimony (Sb^{III}). Although these antimony resistant parasites showed more virulence than the corresponding sensitive culture, in both *in vitro* and *in vivo* infection models, licarin A was equally effective against both strains. It was also observed that Swiss mice infected with *L. (L.) amazonensis* and treated with licarin A and ascorbic acid had significant reduction of 40.78% ($p \leq 0.05$) in lesion size from the fourth week of treatment, as well as reduction in the parasitic load on the lymph node and spleen of these animals. In addition, paw histoarchitecture of treated animals was partially restored by reorganization of collagen fibers, reduction of edema and cell infiltrate in the dermis, hypodermis and between the muscle fibers. This result was also associated with an immunomodulatory response, due to an increase in interferon (IF)- γ production of 266.7% ($p \leq 0.001$) by the lymph node cells of treated animals. The co-treatment with licarin A and ascorbic acid had no significant toxicity, since the animals did not present alteration in the weight, coat or in biochemical and hematological parameters analyzed. Thus, it can be concluded that licarin A has expressive antileishmanial activity in the murine model, being a promising molecule to be better investigated in the search for new treatments for leishmaniasis.

Keywords: Licarin A. *L. (L.) amazonensis*. Antileishmanial activity.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Protocolo de tratamento de camundongos <i>Swiss</i> infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	66
Tabela 2 - Concentração inibitória de 50% do crescimento (CI50) de promastigotas e concentração efetiva de 50% (CE50) de amastigotas axênicas de <i>L. (L.) amazonensis</i> na presença da Licarina A, Antimoniato de Meglumina e Anfotericina B.	77
Tabela 3. Concentração inibitória de 50% do crescimento (CI50) de promastigotas e concentração efetiva de 50% (CE50) de amastigotas axênicas de <i>L. (L.) amazonensis</i> sensível [PH8(S)] e resistente [PH8(R)] ao antimônio trivalente da Licarina A, Antimonial trivalente e Anfotericina B.....	111
Tabela 4 – Parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos <i>Swiss</i> infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> e tratados com a Licarina A e/ou Ácido ascórbico.	127
Tabela 5 – Parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos <i>Swiss</i> infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> e tratados com a Licarina A e/ou Ácido ascórbico.	128

Lista de Figuras

Figura 1 – Mapas de distribuição das leishmanioses.....	17
Figura 2 – Manifestações clínicas das leishmanioses.....	19
Figura 3 – Taxonomia de <i>Leishmania</i> sp.	22
Figura 4 – Fotomicrografia de formas promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania</i> sp.	23
Figura 5 – Hospedeiro invertebrado e reservatórios silvestres de <i>Leishmania</i> sp.....	24
Figura 6 – Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp.....	25
Figura 7 – Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp. em um vetor competente.....	26
Figura 8 – Principais propriedades farmacológicas de drogas antimoniais.	35
Figura 9 – Representação da neolignana licarina A.....	43
Figura 10 – Reação de síntese da Licarina A.	52
Figura 11 – Fotomicrografias de macrófagos murinos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> e tratados com a neolignana licarina A.	82
Figura 12 – Fotomicrografias representativas das patas de camundongos Swiss infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> e tratados com ácido ascórbico e/ou licarina A.....	120
Figura 13 – Fotomicrografias representativas do lado da pata recoberta por pele delgada de camundongos Swiss infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> e tratados com ácido ascórbico e/ou licarina A.....	122
Figura 14 – Fotomicrografias representativas do lado da pata recoberta por pele espessa de camundongos Swiss infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> e tratados com ácido ascórbico e/ou licarina A.....	123

Lista de Gráficos

Gráfico 1 – Inibição do crescimento das formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> na presença de diferentes concentrações da Licarina A.	73
Gráfico 2 – Citotoxicidade da licarina A sobre formas amastigotas axênicas de <i>L. (L.) amazonensis</i> na presença de diferentes concentrações.	76
Gráfico 3 – Efeito da licarina A e do antimonio de meglumina sobre a porcentagem de macrófagos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	79
Gráfico 4 – Efeito da licarina A e do antimonio de meglumina sobre o número de amastigota por macrófagos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	80
Gráfico 5 – Efeito da licarina A e do antimonio de meglumina sobre o índice de infecção de macrófagos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	81
Gráfico 6 - Níveis das citocinas TNF- α , IL-12, IL-6, IL-10 e nitrito produzidos por macrófagos murinos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> e tratados com licarina A.	85
Gráfico 7 – Inibição de crescimento de formas promastigotas sensível e resistente frente a diferentes concentrações do antimonial trivalente.	91
Gráfico 8 – Perfil de crescimento de formas sensível e resistente ao antimonial trivalente.	93
Gráfico 9 – Análise da infectividade <i>in vitro</i> de culturas sensível e resistente ao Sb ^{III}	95
Gráfico 10 – Tamanho de lesão e peso de camundongos Swiss infectados experimentalmente com culturas sensível e resistente ao Sb ^{III}	98
Gráfico 11 – Carga parasitária da lesão e do linfonodo poplíteo dos camundongos Swiss infectados com culturas de <i>L. (L.) amazonensis</i> sensível e resistente ao antimonial trivalente.	99
Gráfico 12 – Atividade dos transportadores ABC em formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> sensível e resistente ao antimonial trivalente.	102
Gráfico 13 – Nível de metilação global de DNA (%) de formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> sensível e resistente ao antimonial trivalente.	105
Gráfico 14 – Inibição do crescimento das formas promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> sensível e resistente ao antimônio trivalente na presença de diferentes concentrações da Licarina A.	109
Gráfico 15 – Citotoxicidade da licarina A sobre formas amastigotas axênicas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> sensível e resistente ao antimônio trivalente.	110

Gráfico 16 – Efeito da Licarina A sobre o índice de infecção de macrófagos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> sensível e resistente ao antimônio trivalente.....	112
Gráfico 17 – Efeito do tratamento com a licarina A e/ou ácido ascórbico no tamanho de lesão de camundongos <i>Swiss</i> infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	116
Gráfico 18 – Efeito do tratamento da licarina A e/ou ácido ascórbico na carga parasitária do linfonodo poplíteo e baço em camundongos <i>Swiss</i> infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	117
Gráfico 19 – Efeito do tratamento da Licarina A e/ou Ácido ascórbico no infiltrado celular e edema da pata de camundongos <i>Swiss</i> infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	124
Gráfico 20 – Peso dos camundongos <i>Swiss</i> infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> durante o tratamento com a licarina A e/ou ácido ascórbico	126
Gráfico 21 – Níveis das citocinas IFN- γ e IL-10 produzidas pelas células do linfonodo poplíteo de camundongos <i>Swiss</i> infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> e tratados com ácido ascórbico e/ou licarina A.....	131

Lista de Abreviatura e Siglas

ABC	– <i>ATP-binding cassette transporters</i>
ACR2	– antimoniato redutase
ALT	– Alanina aminotransferase
Amb	– anfotericina B
AQP1	– aquagliceroporina 1
AST	– Aspartato aminotransferase
ATP	– trifosfato de adenosina (adenosine triphosphate)
B.O.D.	– <i>Biochemical oxygen demand</i> (demanda biológica de oxigênio)
CD4+	– linfócito T auxiliar dotado do receptor CD4.
CHCM	– Concentração hemoglobínica corpuscular média
DMSO	– dimetilsulfóxido
DNA	– ácido desoxirribonucléico (desoxiribonucleic acid)
CC₅₀	– Concentração citotóxica sobre 50% de macrófagos
CEUA	– Comitê de Ética no Uso de Animais
CE₅₀	– Concentração efetiva que causa efeito sobre 50% dos organismos
CI₅₀	– concentração inibitória de 50% do crescimento
GSH	– glutationa
HCM	– Hemoglobina corpuscular média
HE	– hematoxilina-eosina
IFN-γ	– interferon gama
IL-4	– interleucina 4
IL-6	– interleucina 6
IL-10	– interleucina 10
IL-12	– interleucina 12
IL-12R	– receptor de IL-12
IPeFarM	– Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos
iNOS	– sintase induzida do óxido nítrico
LCD	– Leishmaniose cutânea difusa
LCL	– Leishmaniose cutânea localizada
LD	– Leishmaniose disseminada
LDCP	– Leishmaniose dérmica pós-calazar
LMC	– Leishmaniose mucocutânea
LPG	– Lipofosfoglicano
LT	– Leishmaniose Tegumentar
LV	– Leishmaniose Visceral
MIP-1β	– proteína inflamatória macrofágica-1 β (monocyte inflammatory protein 1 β)
MØ	– macrófago
MDR1	– gene de resistência a múltiplas drogas (<i>multidrug resistance protein 1</i>)

MFI – média de intensidade de fluorescência
MRP – Proteínas Associadas a Resistência à Múltipla Drogas (*multidrug resistance-associated protein*)
MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difenil tetrazólio
NK – célula natural killer
NNN – meio sólido Novy, McNeal e Nicolle
NO – óxido nítrico (nitric oxide)
PBS – tampão fosfato salino (phosphate buffered saline)
PgP – P-glicoproteína
PH8 (R) – *Leishmania (L.) amazonensis* resistente ao antimonial trivalente
PH8 (S) – *Leishmania (L.) amazonensis* sensível ao antimonial trivalente
Rev 205 – reversina 205
Rho123 – rodoamina 123
ROS – espécies reativas do oxigênio
Sb^{III} – antimonial trivalente
Sb^V – antimonial pentavalente
SBF – soro bovino fetal
WHO – Organização Mundial da Saúde (World Health Organization)
TDR1 – tiol dependente redutase
TGF- β – fator transformador do crescimento β (transforming growth factor β)
Th0 – Linfócito T auxiliar não-diferenciado
Th1 – linfócito T auxiliar tipo 1
Th2 – linfócito T auxiliar tipo 2
TNF- α – fator de necrose tumoral α (tumour necrosis factor α)
T(SH)2 – tripanotiona
VCM – volume corpuscular médio

Sumário

1. INTRODUÇÃO	16
1.1. Leishmanioses.....	16
1.2. Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> sp.	21
1.3. Resposta imunológica à infecção por <i>Leishmania</i> sp. em modelo murino... ..	28
1.4. Tratamento das leishmanioses	32
1.4.1. Antimoniais Pentavalentes.....	32
1.4.2. Pentamidina	36
1.4.3. Anfotericina B.....	37
1.4.4. Miltefosina.....	38
1.4.5. Paramomicina	39
1.5. O Ácido Ascórbico	40
1.6. Produtos Naturais e os Lignóides	42
2. OBJETIVOS	48
2.1. OBJETIVO GERAL	48
2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS	48
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	51
3.1. Síntese da neolignana Licarina A	51
3.2. Preparação das soluções da neolignana licarina A e do ácido ascórbico.....	52
3.3. Parasitas e manutenção das culturas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	53
3.4. Seleção de <i>L. (L.) amazonensis</i> resistentes ao antimonial trivalente	54
3.5. Obtenção das formas amastigotas axênicas <i>in vitro</i>	54
3.6. Avaliação da atividade antileishmania da Licarina A sobre formas promastigotas de <i>Leishmania</i> sp.....	55
3.7. Avaliação da atividade antileishmania da licarina A sobre formas amastigotas axênicas	56
3.8. Avaliação da atividade da Licarina A sobre macrófagos murinos infectados <i>in vitro</i> com <i>Leishmania (L.) amazonensis</i>	57
3.8.1. Coleta de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss	57
3.8.2. Atividade da neolignana licarina A sobre amastigotas intracelulares	58
3.8.3. Determinação dos níveis de óxido nítrico	59
3.8.4. Detecção de citocinas através de ensaio imunoenzimático (ELISA).....	59
3.9. Curva de crescimento de <i>L. (L.) amazonensis</i> resistente ao antimonial trivalente.....	60
3.10. Análise do perfil de infecção <i>in vitro</i> de <i>L. (L.) amazonensis</i> resistente ao antimonial trivalente.....	61
3.11. Análise do perfil de infecção <i>in vivo</i> de <i>L. (L.) amazonensis</i> resistente ao antimonial trivalente.....	61
3.12. Avaliação da carga parasitária	62
3.13. Análise da atividade de transportadores ABC em <i>L. (L.) amazonensis</i> resistentes ao antimonial trivalente	62

3.14. Análise do nível de metilação global de <i>L. (L.) amazonensis</i> resistente ao antimonial trivalente	63
3.14.1. Extração de DNA de <i>L. (L.) amazonensis</i>	63
3.14.2. Avaliação do nível de metilação global de <i>L. (L.) amazonensis</i>	64
3.15. Avaliação da atividade biológica da licarina A associada ao ácido ascórbico em camundongos Swiss infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	65
3.15.1. Tratamento de camundongos Swiss infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	65
3.15.2. Avaliação da carga parasitária após tratamento de camundongos Swiss infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	67
3.15.3. Análise de citocinas produzidas pelas células do linfonodo poplíteo	68
3.15.4. Análise histológica das patas infectadas dos camundongos Swiss	68
3.15.5. Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos	70
3.16. Análise Estatística	71
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	73
4.1. Atividade antileishmania da Licarina A sobre formas promastigotas <i>in vitro</i>	73
4.2. Atividade Antileishmania da Licarina A sobre formas amastigotas axênicas <i>in vitro</i>	75
4.3. Avaliação da atividade biológica da Licarina A sobre macrófagos murinos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	78
4.3.1. Atividade antileishmania da licarina A sobre amastigotas intracelulares	78
4.3.2. Atividade imunomoduladora da licarina A sobre macrófagos infectados com <i>L. (L.) amazonensis in vitro</i>	84
4.4. Obtenção e análise de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> resistentes ao antimonial trivalente	88
4.4.1. Obtenção de <i>L. (L.) amazonensis</i> resistentes ao antimonial trivalente	89
4.4.2. Perfil de crescimento de <i>L. (L.) amazonensis</i> resistentes ao antimonial trivalente em meio de cultivo	92
4.4.3. Perfil da infecção de <i>L. (L.) amazonensis</i> resistente ao antimonial trivalente <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	94
4.4.3.1. Infecção <i>in vitro</i> de macrófagos murinos com <i>L. (L.) amazonensis</i> sensível ou resistente ao antimonial trivalente	94
4.4.3.2. Infecção <i>in vivo</i> de camundongos Swiss com <i>L. (L.) amazonensis</i> sensível ou resistente ao antimonial trivalente	97
4.4.4. Avaliação da atividade de transportadores ABC em <i>L. (L.) amazonensis</i> resistentes ao antimonial trivalente	100
4.4.5. Análise perfil de metilação global de DNA de <i>L. (L.) amazonensis</i> resistentes ao antimonial trivalente	104
4.4.6. Atividade da Licarina A sobre formas promastigotas e amastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> resistente ao antimonial trivalente	108
4.5. Análise da atividade biológica da licarina A associada ao ácido ascórbico na terapêutica da leishmaniose experimental cutânea	114
4.5.1. Efeito do tratamento da licarina A associada ao ácido ascórbico em camundongos Swiss infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	115
4.5.2. Análise histológica das patas de camundongos Swiss infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i> e tratados com licarina A associado ao ácido ascórbico	119

4.5.3. Análise de parâmetros relacionados à toxicidade do tratamento com a licarina A associada ao ácido ascórbico sobre camundongos infectados com <i>L. (L.) amazonensis</i>	125
4.5.4. Análise da resposta imunomoduladora.....	130
5. CONCLUSÕES	134
REFERÊNCIAS.....	136
ANEXOS	160

1 INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmanioses

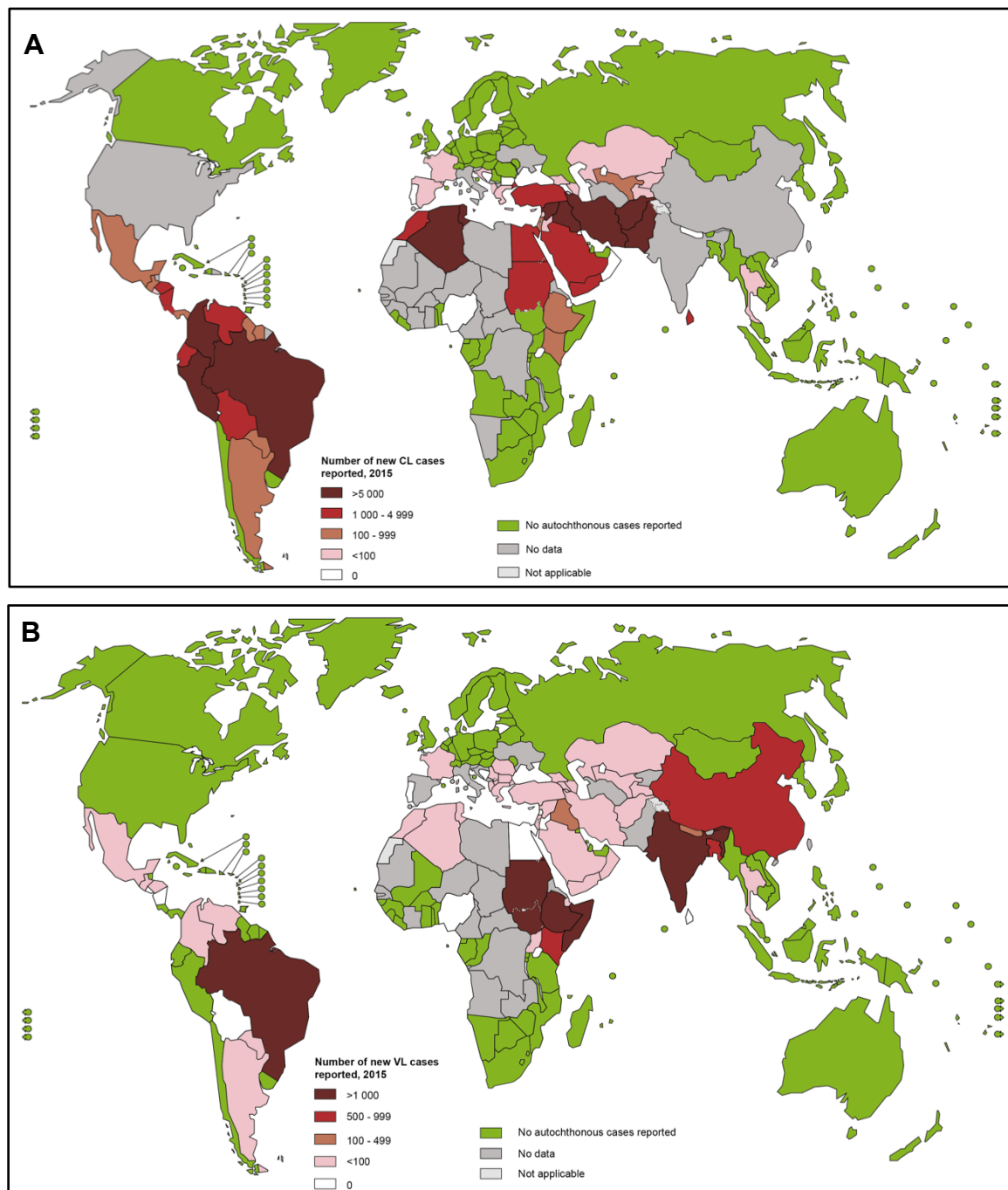
As leishmanioses constituem um complexo de doenças infecto-parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania*. Essas doenças estão inseridas no grupo de Doenças Tropicais Negligenciadas, que acometem principalmente habitantes de condições socioeconômicas mais desfavoráveis (HOTEZ et al., 2007; LINDOSO; LINDOSO, 2009; FEASEY et al., 2010; WHO, 2017a). As leishmanioses são consideradas endêmicas em 98 países, sendo 72 países presentes no velho mundo e 26 no novo mundo (ALVAR et al., 2012; PIGOTT et al., 2014; WHO, 2017a; WHO, 2017b). Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMG), estima-se que cerca de 12 milhões de pessoas são portadores dessas enfermidades, e que anualmente ocorra o surgimento de cerca 1 milhão de novos casos e cerca de 20.000 a 30.000 mortes em decorrência dessas doenças (WHO, 2017c).

Em humanos, a infecção causada por *Leishmania* spp. resulta em diversas formas clínicas da doença, que podem ser agrupadas em leishmaniose tegumentar (LT), caracterizada por infecção confinada a derme, e leishmaniose visceral (LV), onde a infecção acomete as vísceras do indivíduo, podendo levar o paciente a óbito se o tratamento for tardio (REITHINGE et al., 2007; DAVID; CRAFT, 2009; GOTO; LINDOSO, 2012). Diversos fatores irão influenciar no tipo de manifestação clínica a ser desenvolvida, dentre eles podemos destacar a espécie de *Leishmania* spp. presente na infecção (infectividade, patogenicidade e virulência), fatores ambientais, além da capacidade imunológica e constituição genética do hospedeiro vertebrado infectado (BOGDAN et al., 1996; ALEXANDRE et al., 1999; MURRAY et al., 2005).

De acordo com a OMG, os países com maior número de casos de LT são Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Peru, República Árabe da Síria, Tunísia e Iémen, onde juntos concentram mais de 87% dos casos de LT (Figura

1A). Já para a leishmaniose visceral, mais de 90% dos casos ocorrem no Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (Figura 1B) (WHO, 2017b).

Figura 1 – Mapas de distribuição das leishmanioses.



Fonte: WHO, 2015a.; WHO, 2015b (A) Distribuição da leishmaniose tegumentar e (B) Distribuição da leishmaniose visceral no ano de 2015.

A LT subdivide-se em quatro tipos básicos de forma clínica: leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose disseminada (LD), leishmaniose cutânea difusa (LCD) e leishmaniose mucocutânea (LMC) (REITHINGE et al., 2007; DAVID; CRAFT, 2009; GOTO; LINDOSO, 2012).

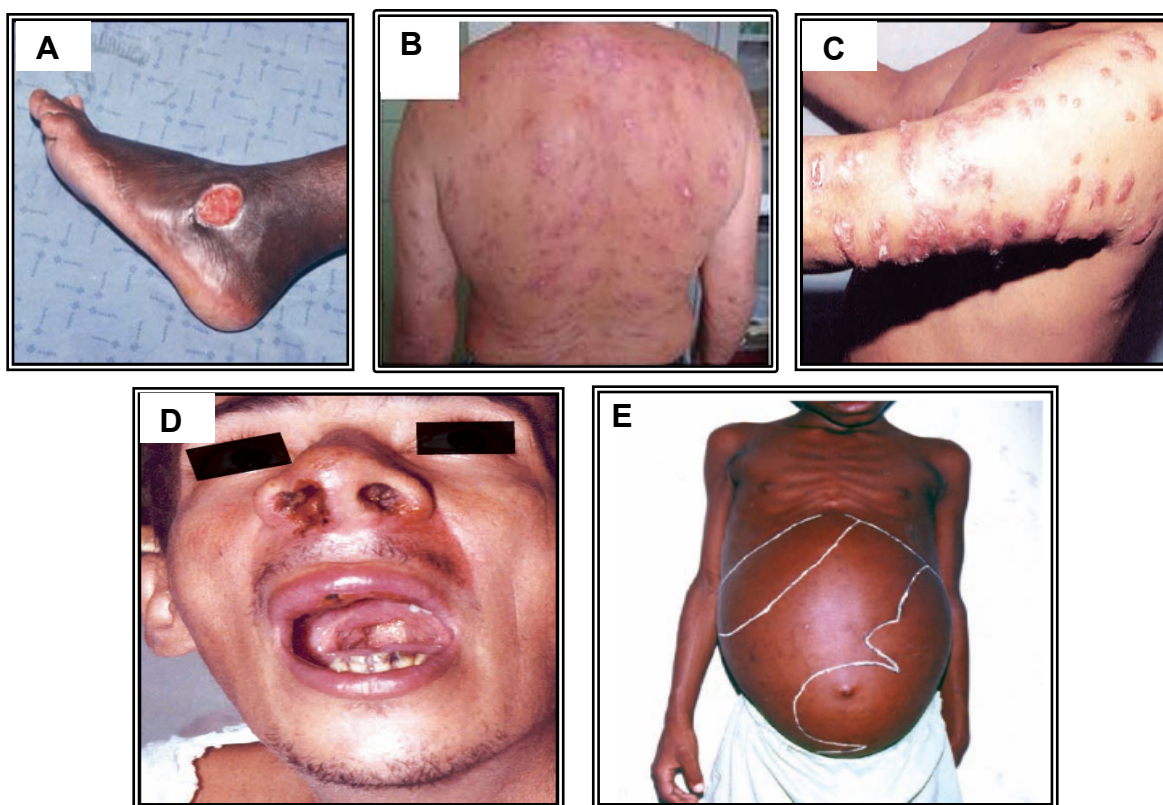
A leishmaniose cutânea localizada (LCL) é a forma mais comum da doença e caracteriza-se pela presença de lesão única ou até 10 lesões, que pode começar como pequenas pápulas vermelhas (5-10mm) e progredir pra lesões de bordas elevadas e centro granuloso avermelhado, nos locais da picada do inseto vetor ou áreas próximas (REITHINGE et al., 2007; DAVID; CRAFT, 2009; GOTO; LINDOSO, 2012) (Figura 2A). No Brasil, ela é causada principalmente pela espécie *Leishmania (Viannia) braziliensis* e, em menor escala, pela espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, apresentando tendência à cura espontânea em aproximadamente 2 a 15 meses, mesmo sem a realização de tratamento medicamentoso (REITHINGE et al., 2007; BRASIL, 2007; GOTO; LINDOSO, 2012).

A leishmaniose disseminada (LD) é caracterizada pela presença de múltiplas lesões (10-300 lesões), distribuídas em diversas áreas do corpo (Figura 2B). Esta manifestação clínica ocorre provavelmente por disseminação hematogênica ou linfática do parasito, resultando em lesões distantes do local da picada do inseto vetor que podem ser ulceradas, papulosas, nodulares e acneiformes. No Brasil, esta forma clínica é atribuída principalmente a *L. (V.) braziliensis* (TURETZ et al., 2002; GOTO; LINDOSO, 2012).

A leishmaniose cutânea difusa (LCD) caracteriza-se pelo aparecimento de lesões não ulcerosas, nódulos e placas extremamente infiltradas com parasitas, que podem disseminar do sítio de infecção para todo corpo devido a disseminação linfática do parasito (Figura 2C) (REITHINGE et al., 2007). Esta é uma manifestação rara e grave da LT que ocorre geralmente em pacientes considerados anérgicos, com deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania* (CONVIT; ULRICH, 1993; REITHINGE et al., 2007; DAVID; CRAFT, 2009). Na América do Sul, a principal espécie relacionada a esta forma clínica é a *L. (L.) amazonensis* (BRASIL, 2007; GOTO; LINDOSO, 2012).

A leishmaniose mucocutânea (LMC) caracteriza-se pelo acometimento das mucosas e cartilagens (Figura 2D), iniciando-se comumente como uma inflamação da mucosa nasal, seguida por ulceração e perfuração do septo. Em alguns casos, o acometimento progressivo de lábios, bochechas, palato mole, faringe ou laringe também estão envolvidos, resultando na desfiguração dessas áreas (REITHINGE et al., 2007; DAVID; CRAFT, 2009). Observa-se nessa forma clínica baixo parasitismo, contudo, as lesões desfigurantes atribuem-se principalmente a resposta imune celular exacerbada com níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias (DA CRUZ et al., 1996). O agente etiológico mais comum no Brasil é a *L. (V.) braziliensis*, ocorrendo em 3% a 5% dos pacientes infectados por essa espécie, e geralmente são casos secundários a lesões cutânea simples (BRASIL, 2007; GOTO; LINDOSO, 2012).

Figura 2 – Manifestações clínicas das leishmanioses.



Fonte: BRASIL, 2006; BRASIL, 2007; GOTO; LINDOSO, 2012 (A) leishmaniose cutânea localizada, caracterizada por lesão única de borda elevada e fundo granulomatoso; (B) leishmaniose disseminada, apresentando múltiplas lesões pequenas e ulceradas nas costas; (C) leishmaniose cutânea difusa, apresentando lesões pápulo-nodulosas com descamação e algumas crostas; (D) leishmaniose mucocutânea, apresentando destruição parcial da região nasolabial; (E) leishmaniose visceral no período final, caracterizada pela intensa desnutrição e hepatoesplenomegalia

A leishmaniose visceral, também conhecida como calazar (do indu *kala-azar*: *kala* = negra, *azar* = febre), caracteriza-se por febre alta, substancial perda de peso, pancitopenia e acometimento das vísceras do hospedeiro pelo parasita, apresentando organomegalia especialmente no fígado e baço (BRASIL, 2006; VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012) (Figura 2E). Caso tenha tratamento tardio, esse tipo de leishmaniose pode levar o paciente a óbito em mais de 95% dos casos (WHO, 2017c). No Brasil, ela é causada principalmente pela espécie *Leishmania (Leishmania) infantum* (BRASIL, 2006; MAIA-ELKHOURY et al., 2008; VAN GRIENSVEN; DIRO, 2012;). Alguns pacientes com LV podem desenvolver a leishmaniose dérmica pós-calazar (LDPC), durante a doença ou após sua cura aparente, sendo caracterizada por pápulas, nódulos, máculas hipopigmentadas e placas infiltradas na pele. A LDPC ocorre principalmente no velho mundo pela *Leishmania (Leishmania) donovani* (SUNDAR, 2001; LINDOSO et al., 2012).

No Brasil, verificou-se a existência de uma expansão geográfica da LT quando, na década de 80, esta foi assinalada em 19 Unidades Federativas, e em 2003, foi confirmada a autoctonia em todos os estados brasileiros (BRASIL, 2007). Segundo o Ministério da Saúde, no período entre 2010 a 2015 foram registrados 124.840 casos de LT no Brasil, distribuídas em todas as Unidades Federativas da seguinte forma: a região Norte representando 42,9% dos casos, seguida pelas regiões Nordeste (32,5%), Centro-Oeste (13,9%), Sudeste (8,3%) e Sul (1,7%). (BRASIL, 2016a). No ano de 2015, foram registrados 19.395 casos em todos os estados brasileiros, onde a região Norte apresentou o maior número de casos (8.939), seguido pela região Nordeste (5.152 casos) (BRASIL, 2016A). No estado da Paraíba, foram registrados 86 casos de LT no ano de 2015, sendo a LC a forma clínica da maioria dos casos, com apenas quatro casos de LMC registrados (BRASIL, 2015). Dentre os municípios que apresentaram o maiores números de registros de LT em 2015 estão Alagoa Nova, Areia, Alagoa Grande, Pilões e Alagoinha (BRASIL, 2015).

A LV é uma doença endêmica no Brasil, onde inicialmente sua ocorrência estava limitada a áreas rurais e a pequenas localidades urbanas, contudo, nos últimos anos encontra-se em franca expansão para os grandes centros, atingindo principalmente populações menos favorecidas economicamente (GONTIJO;

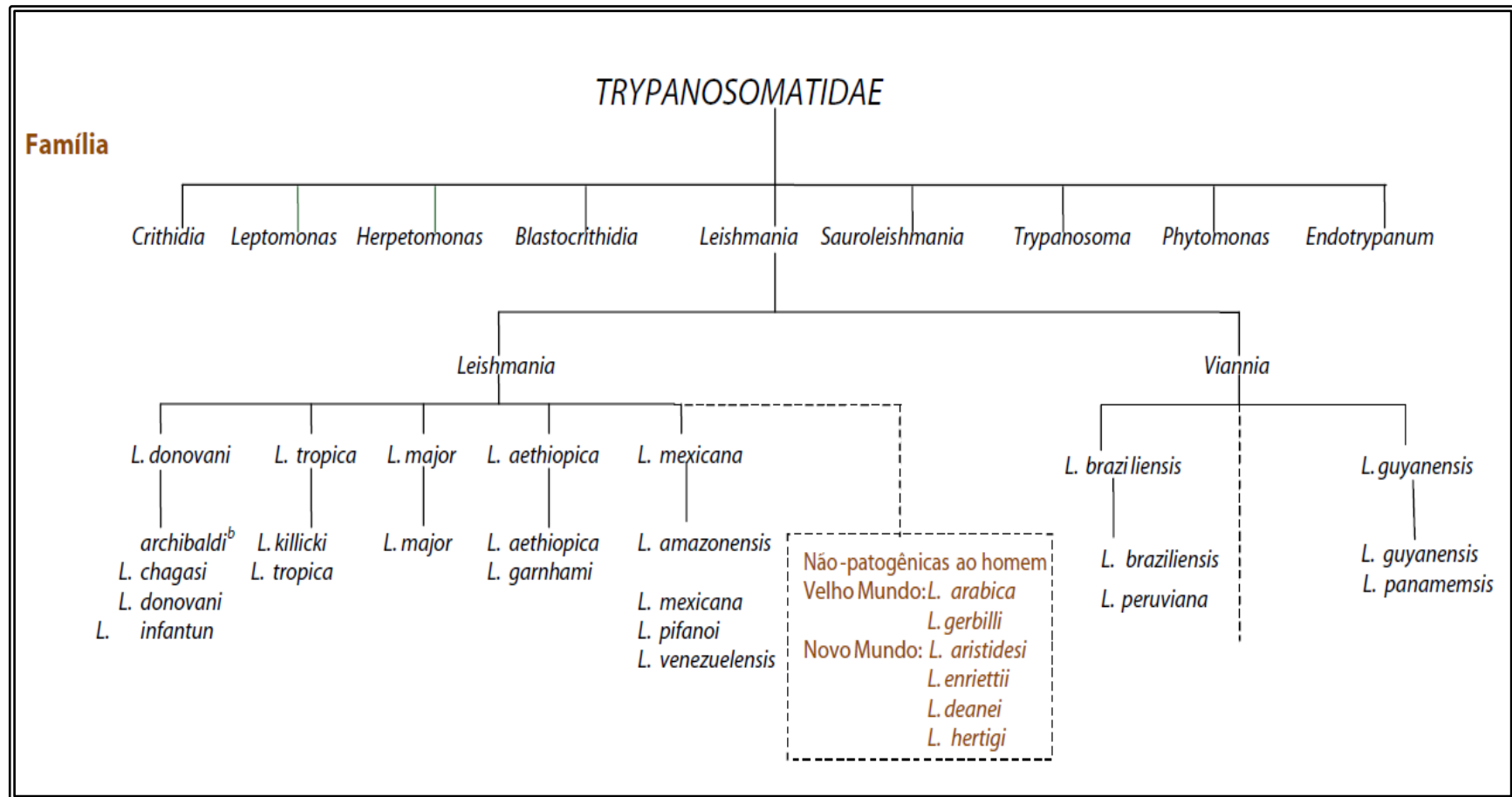
MELO, 2004; BRASIL, 2006). Segundo o Ministério da Saúde, apesar da região Nordeste concentrar o maior número de casos de LV, dados recentes confirmam a expansão da doença da região Nordeste para outras regiões, visto que no ano de 2000, cerca de 83% dos casos ocorria nesta região, e no ano de 2015, reduziu para 50% dos casos (BRASIL, 2016b). Entre o período de 2010 a 2015 foram registrados 20.453 casos de LV, sendo o maior número de casos ocorridos no Nordeste (50,73%), seguidos pelas regiões Norte (17%), Sudeste (15,51%), Centro-Oeste (7,85%) e Sul (0,05%) (BRASIL, 2016b). No ano de 2015, foram registrados 3.289 casos de LV em todos os estados do Brasil, sendo a região Nordeste aquela que apresentou o maior número de casos (1.806 casos) seguidos pela região Sudeste (538 casos) (BRASIL, 2016b). Com relação ao estado da Paraíba, foram registrados 47 casos de LV no ano de 2015 distribuídos em 10 municípios, sendo as principais cidades de ocorrência Campina Grande (10 casos) e João Pessoa (7 casos) (BRASIL, 2015).

1.2. Ciclo de vida de *Leishmania* sp.

Os protozoários do gênero *Leishmania* (ROSS, 1903) são organismos unicelulares que apresentam um ciclo de vida heteroxênico, caracterizado por duas alternadas formas morfológicas de desenvolvimento: as promastigotas e as amastigotas. Esses protozoários apresentam uma diversidade considerável, com pelo menos 22 espécies patogênicas ao homem (FRAGA et al., 2010).

Os parasitas do gênero *Leishmania* pertencem ao Sub-reino Protozoa, Filo Sarcomastigophora, Ordem Kinetoplastida, Família Trypanosomatidae, sendo o gênero dividido em dois subgêneros, de acordo com o local de desenvolvimento das formas promastigotas no inseto vetor: no subgênero *Leishmania* o desenvolvimento ocorre no intestino médio; já no subgênero *Viannia* o desenvolvimento ocorre no intestino posterior (LAISON; SHAW, 1987 apud GOSSAGE et al., 2003) (Figura 3).

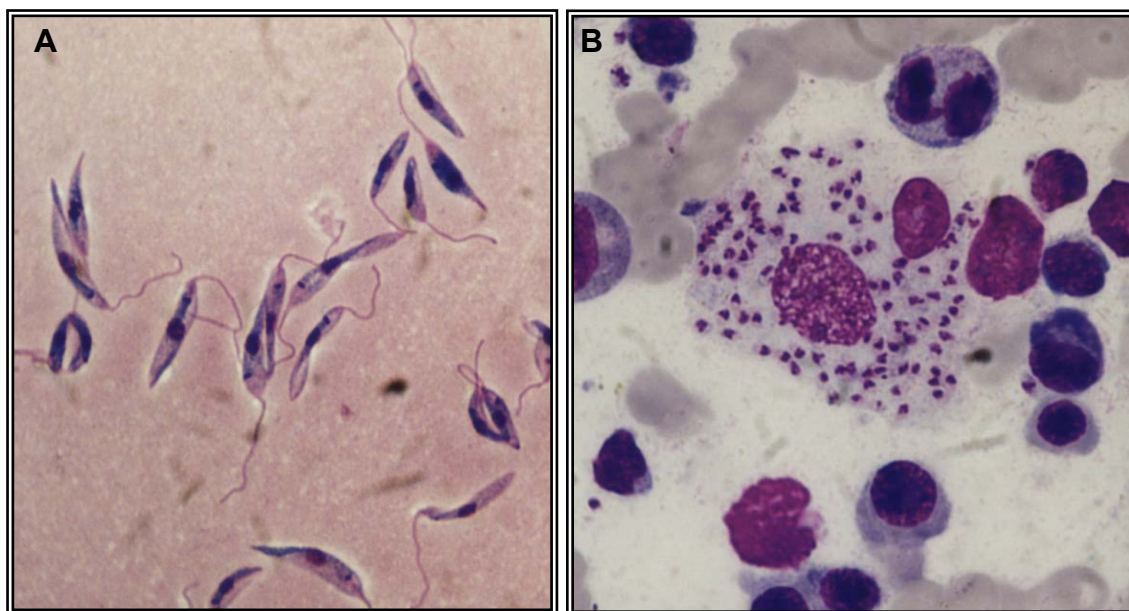
Figura 3 – Taxonomia de *Leishmania* sp.



Fonte: Brasil, 2007; LAISON & SHAW, 1987 apud MICHALICK, 2000.

As formas promastigotas (Figura 4A) estão presentes no intestino do inseto vetor, e caracterizam-se pela forma alongada (5-20 x 1-4µm) e flagelo livre, que emerge da região posterior e mede cerca de 20 µm de comprimento. Já as formas amastigotas (Figura 4B) apresentam formato ovalado, medindo cerca de 2 x 4µm, e possuem flagelo rudimentar. Essas formas são parasitas intracelulares obrigatórios do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados (VANNIER-SANTOS et al., 2002).

Figura 4 – Fotomicrografia de formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* sp.



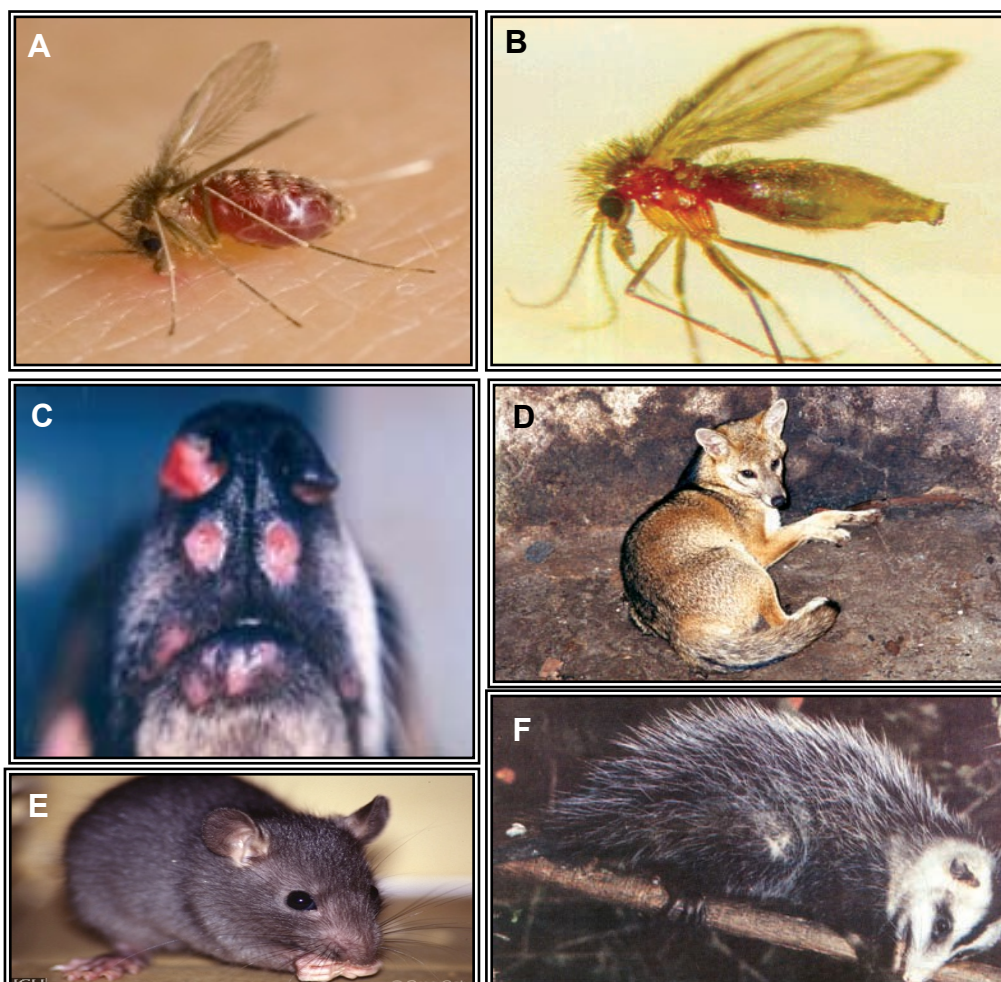
Fonte: Laboratório de Biologia de Leishmania. (A) cultura de promastigotas de *Leishmania chagasi*. Coloração hematológica panótico. A.T.: 1000x. (B) Aspirado de medula óssea humana. Macrófago (MØ) infectado com formas amastigotas de *Leishmania*. Coloração hematológica panótico. A.T.: 1000x.

Dípteros da subfamília Phlebotominae são os vetores das várias espécies de *Leishmania*, com prevalência do gênero *Phlebotomus* (Figura 5A) no Velho Mundo, e do gênero *Lutzomyia* (Figura 5B) no Novo Mundo. Apenas os flebótomos fêmeas transmitem a doença, pois necessitam se alimentar de sangue para maturação de seus ovos (KILLICK-KENDRICK, 1999; ANDRADE et al., 2007). Dentre as 400 espécies de flebótomos conhecidos, apenas cerca de 50 foram identificadas como possíveis vetores da leishmaniose (KAMHAWI, 2006),

pois, para ser considerado um vetor, devem existir interações específicas parasita-hospedeiro que conduzam a sobrevivência do parasita em seu sistema digestório, a colonização deste local pelas formas promastigotas, bem como o seu desenvolvimento em formas infectantes (KILLICK-KENDRICK, 1999; NIEVES; PIMENTA, 2000).

Os principais reservatórios dessas doenças incluem diversas espécies de mamíferos, a exemplo do cão (*Canis familiaris*) (Figura 5C), tido como principal fonte de infecção na área urbana, as raposas (Figura 5D), roedores (Figura 7E) e marsupiais (*Didelphis albiventris*) (Figura 5F), no ambiente silvestre (BRASIL, 2006; BRASIL, 2007), além de, ocasionalmente, o homem.

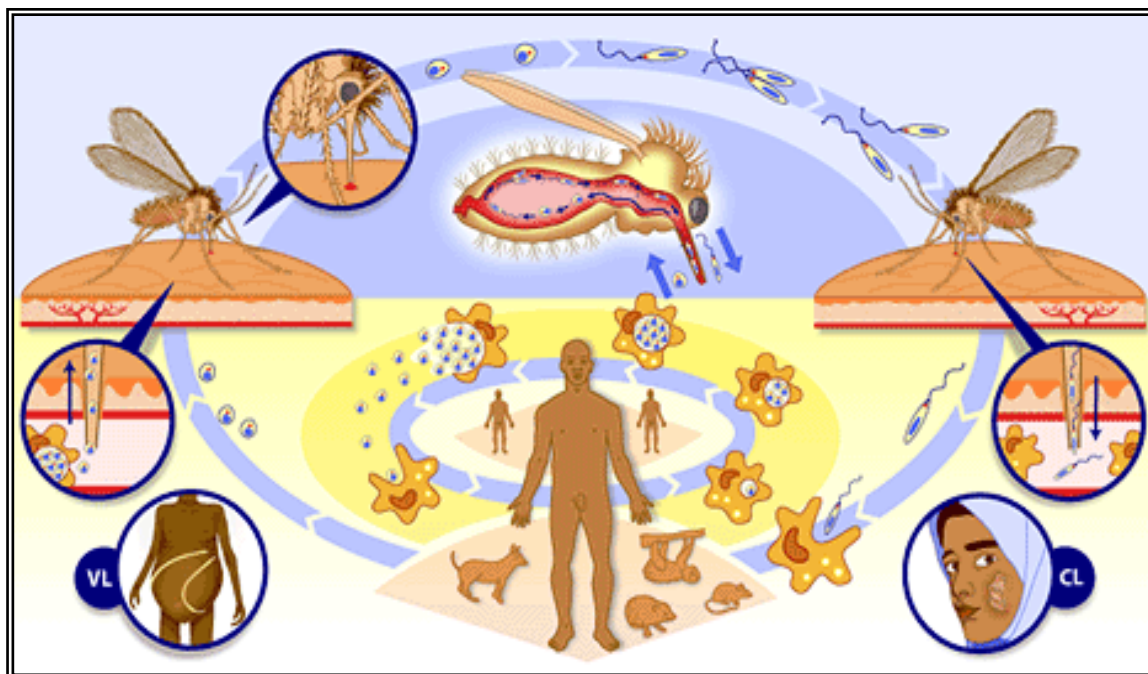
Figura 5 – Hospedeiro invertebrado e reservatórios silvestres de *Leishmania* sp.



Fonte: Brasil, 2006; BRASIL, 2007. (A) *Phlebotomus papatasi*; (B) *Lutzomyia longipalpis*; (C) cão doméstico (*Canis familiaris*); (D) Raposa - *Dusicyon vetulus*; (E) Roedor - *Rattus rattus*; (F) Marsupial - *Didelphis albiventris*.

No hospedeiro invertebrado, o ciclo de vida do parasita inicia-se quando o flebotomíneo alimenta-se do sangue de um mamífero infectado, sugando as formas amastigotas presentes no interior dos macrófagos (Figura 6). No intestino do vetor, o sangue contendo as formas amastigotas ficam envolvidos por uma estrutura quitinosa secretada pelo epitélio do intestino denominada matriz peritrófica. Dentro da matriz, os parasitas transformam-se em formas promastigotas procíclicas avirulentas (VANNIER-SANTOS et al., 2002; KAMHAWI, 2006).

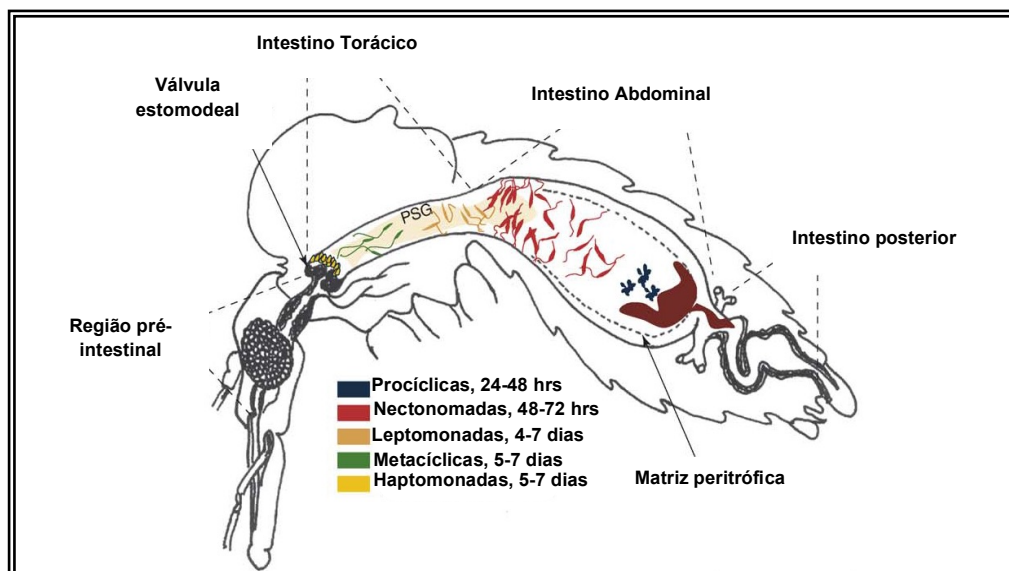
Figura 6 – Ciclo de vida de *Leishmania* sp.



Fonte: WHO/TDR, 2012. Parasitas do gênero *Leishmania* são transmitidos para o hospedeiro vertebrado através da picada do inseto vetor infectado, no qual injeta formas promastigotas metacíclicas ou infectantes. Estas são fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado, principalmente macrófagos, onde irão se transformar em formas amastigotas no interior do fagolisossomo, replicando-se até ocorrer lise celular. O flebotomíneo sadio, ao se alimentar do sangue deste hospedeiro vertebrado infectado, suga as formas amastigotas que se transformam em formas promastigotas procíclicas no seu intestino. Estas passam por um processo denominado metaciclogênese, originando as promastigotas metacíclicas, que podem ser transmitidas para um novo hospedeiro vertebrado. CL: *cutaneous leishmaniasis* (leishmaniose cutânea); VL: *visceral leishmaniasis* (leishmaniose visceral).

Durante o ciclo de vida no vetor (Figura 7), observam-se diferentes estágios de desenvolvimento das formas de promastigotas (NIEVES; PIMENTA, 2000; VANNIER-SANTOS et al., 2002). Primeiro, é observado o desenvolvimento das promastigotas procíclicas, que se multiplicam intensamente, seguida das nectomonadas, cuja forma é mais larga e tem como primordiais funções o escape da membrana peritrófica, ancoramento nas células epiteliais do intestino e início da migração para a parte anterior do intestino do inseto (VANNIER-SANTOS et al., 2002; KAMHAWI, 2006). As formas leptomonadas provêm das nectomonas, e sua intensa multiplicação resulta na infecção massiva do intestino anterior. Nos últimos estágios de desenvolvimento encontram-se as haptomonadas, cuja procedência é incerta (nectomonadas ou leptomonadas) e as metacíclicas, originadas das formas leptomonadas (VANNIER-SANTOS et al., 2002; GOSSAGE et al., 2003; KAMHAWI, 2006). Estas últimas promastigotas são também denominadas infectantes devido a sua alta virulência para o hospedeiro vertebrado (NIEVES; PIMENTA, 2000; KAMHAWI, 2006).

Figura 7 – Ciclo de vida de *Leishmania* sp. em um vetor competente.



Fonte: Adaptado de KAMHAWI, 2006. Ilustração do aparecimento de formas morfológicas distintas de promastigotas no interior do inseto vetor.

O tempo necessário para os parasitas completarem seu desenvolvimento e migração no inseto é de aproximadamente 6 a 9 dias, dependendo da espécie (KAMHAWI, 2006). Denomina-se metaciclogênese o conjunto de modificações observadas durante a evolução de promastigotas avirulentas em promastigotas virulentas (VANNIER-SANTOS et al., 2002; KAMHAWI, 2006). Durante esse processo, são observados modificações na morfologia dos parasitas, que ficam com corpo celular mais afilado e flagelo mais alongado, o que lhe confere maior locomoção (DA SILVA et al., 2015), além de modificações bioquímicas, como alterações nas moléculas de lipofosfoglicano (LPG) e da glicoproteína *gp63* presentes na superfície do parasita.

A presença do LPG na superfície celular dos parasitas é um importante fator para sua permanência no interior do vetor, e sua não-eliminação, visto que essas moléculas ligam-se a lectinas presentes em seu epitélio intestinal posterior do inseto (SACKS et al., 2000; KAMHAWI, 2006). Durante a metaciclogênese as moléculas de LPG tornam-se mais longas e complexas, fazendo com que os parasitas agora consigam migrar para a região anterior do intestino do inseto para serem inoculadas no mamífero durante o repasto sanguíneo, além de conferir proteção às *Leishmanias* contra o sistema imunológico desse novo hospedeiro (SACKS, 2001). A maior expressão da glicoproteína *gp63* nas formas metacíclicas também confere proteção aos parasitas contra o sistema imune inato do mamífero, além de facilitar sua internalização pelos macrófagos via receptores que não o ativam, sendo outro importante fator de virulência desses protozoários (OLIVIER et al., 2012)

No hospedeiro vertebrado, a infecção ocorre quando o flebótomo infectado se alimenta do sangue desse mamífero (ex. homem) (Figura 6). Durante o repasto sanguíneo, o aparelho bucal do inseto produz um pequeno hematoma de sangue do qual se alimentam e também introduz as formas promastigotas metacíclicas (VANNIER-SANTOS et al., 2002; MOUGNEAU et al., 2011). A saliva do vetor também é injetada, contribuindo para o estabelecimento da infecção devido à presença de moléculas com propriedades imunomoduladoras (KAMHAWI, 2000; MONTEIRO et al., 2007). As promastigotas metacíclicas são fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente macrófagos. No interior dos macrófagos, os parasitas presentes no vacúolo parasitóforo transformam-se

rapidamente em amastigotas, adaptando-se as novas condições e multiplicando-se constantemente até lisar a célula hospedeira. As amastigotas liberadas na corrente sangüínea são fagocitadas por outros macrófagos, iniciando uma reação inflamatória no local, fechando assim o ciclo de vida desses parasitas (VANNIER-SANTOS et al., 2002).

1.3. Resposta imunológica à infecção por *Leishmania* sp. em modelo murino

O tipo de resposta imune apresentada pelo hospedeiro vertebrado ao interagir com o parasita terá papel fundamental na estabilização e manifestação clínica da doença (BOGDAN et al., 1996). Tanto a resposta imune humoral quanto a celular ocorre durante a infecção, contudo, a cura clínica dessas doenças está associada especialmente à resposta imune celular, especificamente na ativação dos macrófagos para eliminação do parasita (BOGDAN et al., 1996; TRIPATHI et al., 2007).

A resposta à infecção por parasitas no gênero *Leishmania* sp. demonstra ser um processo que também depende do genótipo do hospedeiro, além da espécie de *Leishmania* envolvida, visto que algumas linhagens de camundongos são susceptíveis a doença enquanto outras são resistentes (BELKAID et al., 2001; SILVA-ALMEIDA et al., 2010). Em modelo murino, grande parte do conhecimento acerca da resposta imune a infecção por esses parasitas provém de estudos com a espécie *Leishmania (Leishmania) major* (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002).

A formação do *pool* hemorrágico e introdução de formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania* durante a infecção do hospedeiro vertebrado inicia uma resposta inflamatória local, resultando no recrutamento de neutrófilos e monócitos (MOUGNEAU et al., 2011). Enquanto os neutrófilos são recrutados para o local inflamatório dentro de minutos após a infecção, uma grande quantidade de monócitos/macrófagos são observados apenas dias após a

infecção com *L. (L.) major* (SUNDERKÖTTER et al., 1993; PETERS et al., 2008; MOUGNEAU et al., 2011).

Em modelo de infecção *in vitro* utilizando a espécie *L. (L.) major*, observou-se que os neutrófilos possuem a capacidade de fagocitar esses parasitas, contudo, estes não se multiplicam e mantêm-se sob a forma promastigotas (LAUFS et al., 2002; VAN ZANDBERGEN, 2004). Os neutrófilos infectados com *Leishmania* têm sua apoptose espontânea retardada (AGA et al., 2002), além de liberar a quimiocina “proteína inflamatória macrofágica-1 β ” (MIP-1 β), que atrai macrófagos para o sítio de infecção (VAN ZANDBERGEN, 2004). Esses macrófagos fagocitam os neutrófilos apoptóticos infectados, e, visto que esta via de internalização não ativa a atividade microbicida dos macrófagos, os parasitas internalizados sobrevivem e se multiplicam dentro dessas células (RAVICHANDRAN; LORENZ, 2007).

Os linfonodos que drenam o local da infecção são absolutamente necessários para o desenvolvimento de uma resposta imune adquirida efetiva dirigida aos parasitas do gênero *Leishmania* (EHRCHEN et al., 2008). Em camundongos infectados, linfócitos T CD4⁺ ativados por células apresentadoras de antígenos (APCs) são detectados no linfonodo de drenagem tanto no início quanto ao longo da infecção (MALHERBE et al., 2000). Estudos experimentais com camundongos isogênicos infectados com *L. (L.) major* demonstraram que a susceptibilidade e resistência à leishmaniose estão ligadas a ativação destes linfócitos T CD4⁺ (Th0) em dois diferentes padrões: Th1 e Th2 (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). A diferenciação destes linfócitos TCD4⁺ depende principalmente das citocinas presentes no início da diferenciação, onde a presença de interleucina (IL)-12, produzida por macrófagos, e de interferon (IFN)- γ , produzida sobretudo por células NK, induzem a diferenciação de um perfil Th1, enquanto que principalmente a IL-4 induz diferenciação de linfócitos Th2 (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002; TRIPATHI et al., 2007; MOUGNEAU et al., 2011).

Em modelo murino, o padrão Th1 está associado à resistência do hospedeiro a infecção por *L. (L.) major*, secretando citocinas como IFN- γ , que induzem os macrófagos a produzirem óxido nítrico (NO) através da óxido nítrico sintase induzida (iNOS) (LIEW et al., 1997; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002;

VILA-DEL SOL et al.; 2007; TRIPATHI et al., 2007), e outras espécies reativas de oxigênio (ROS) (MURRAY; NATHAN, 1999; BOGDAN et al., 2000; MUKBEL, 2007; ASSCHE et al., 2011), ambas letais para o parasita. A produção do fator de necrose tumoral (TNF)- α por essas células fagocíticas também induz a atividade leishmanicida dos macrófagos pela indução da iNOS e consequente produção de NO (LIEW et al., 1990; BOGDAN et al., 2000; MUNIZ-JUNQUEIRA; PAULA-COELHO, 2008; VILA-DEL SOL et al., 2007).

Por outro lado, a susceptibilidade em camundongos isogênicos infectados com *L. (L.) major* está relacionada ao padrão Th2, que secretam citocinas que promovem resposta humoral, como IL-4, IL-10 e fator transformador de crescimento (TGF)- β . Foi observado que a resposta humoral não é eficiente para a eliminação do parasita intracelular, além dessas citocinas inibirem a resposta Th1, como por exemplo, a IL-10 que inibe a produção de IL-12 pelos macrófagos e o TGF- β que suprime a produção de IFN- γ inicial, por células NK, necessário para o estabelecimento da resposta Th1 (TRINCHIERI, 2001; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002; TRIPATHI et al., 2007; ROGERS et al., 2002).

A interleucina (IL)-6 também participa na diferenciação de linfócitos T CD4⁺ em Th1/Th2. Observou-se que a presença da IL-6 promove uma diferenciação Th2, pois induz a produção de IL-4, além de bloquear diretamente a via de sinalização de IFN- γ , e dessa forma, impede uma resposta Th1 (RINCÓN et al., 1997; DIEHL; RINCÓN, 2002). Contudo, a participação da IL-6 na resposta imunológica apresenta algumas divergências. Em modelo de leishmaniose experimental, observou-se que camundongos deficientes para o gene IL-6 (IL-6^{-/-}) infectados com *L. (L.) major* não apresentaram diferença no curso da infecção (tamanho de lesão e carga parasitária) quando comparados aos animais selvagens (TITUS et al., 2001). No entanto, verificou-se que estes camundongos IL-6^{-/-} foram capazes de controlar a infecção hepática causada por *L. (L.) donovani*, e isto foi correlacionado a um aumento nos níveis de IFN- γ , indicando uma atividade inibitória desta citocina no desenvolvimento de uma resposta Th1 (MURRAY, 2008). A presença de altos níveis desta citocina em pacientes com leishmaniose tegumentar (KOCYIGIT et al., 2002) e visceral (PERUHYPE-

MAGALHÃES et al., 2006; ANSARI et al., 2006) também foi observada, contudo, seu papel na infecção em humanos ainda permanece incerto.

Em infecções experimentais utilizando a espécie *L. (L.) amazonensis*, a predominância de uma resposta estritamente Th1 ou Th2 não pode ser estabelecida, devido ao diferentes graus de susceptibilidade que os camundongos apresentam (PEREIRA; ALVES, 2008). Diferente do observado para infecção com *L. (L.) major*, praticamente todas as linhagens de camundongos isogênicos apresentam-se susceptíveis a infecção com *L. (L.) amazonensis*, com diferentes graus de susceptibilidade (CUPOLILO et al., 2003; PEREIRA; ALVES, 2008). Observou-se que camundongos BALB/c são altamente susceptíveis à infecção com *L. (L.) amazonensis*, desenvolvendo lesões crônicas e progressivas que evoluem para metástase (PEREIRA; ALVES, 2008; CUPOLILO et al., 2003; ABREU-SILVA et al., 2004). Camundongos C57BL/10 também apresentam-se susceptíveis a essa infecção, enquanto camundongos C57BL/6, C3H, DBA e CBA são menos susceptíveis, apresentando lesões menores mas com persistente carga parasitária (PEREIRA; ALVES, 2008).

A resposta imunológica associada à infecção com *L. (L.) amazonensis* varia conforme o modelo murino utilizado, sendo as vezes associado apenas à inabilidade dos animais de promover uma resposta Th1 efetiva, outras vezes ao desenvolvimento de uma resposta Th2 ou a uma mistura desses dois padrões (PEREIRA; ALVES, 2008). Foi observado que a IL-4 é uma importante citocina associada ao padrão susceptível observado em camundongos BALB/c, visto que animais BALB/c deficientes em IL-4 apresentaram altos níveis de IFN- γ (GUIMARAES et al., 2006), e sua neutralização em camundongos BALB/c IL-10^{-/-} (com anti-IL-4) levou ao controle da infecção, demonstrando que ambas as citocinas promovem o padrão susceptível do animal através da inativação de uma resposta Th1 (PADIGEL et al., 2003). Neste último trabalho, os animais IL-10^{-/-} também apresentaram aumento na produção de NO e IFN- γ (PADIGEL et al., 2003). No entanto, Jones; Buxbaum; Scott (2000) verificaram que o padrão susceptível do BALB/c foi independente dos níveis de IL-4, mas sim relacionados a ausência do receptor de IL-12 (IL-12R), sugerindo uma incapacidade do animal de montar uma resposta Th1 efetiva.

Já para o animal C57BL/6 observou-se que a presença da citocina IL-4 não é fator determinante da susceptibilidade, visto que animais C57BL/6 IL-4^{-/-} ou C57BL/6 tratados com anti-IL-4 ainda desenvolvem lesões progressivas (PEREIRA; ALVES, 2008), sendo a presença da lesão nessa linhagem mais associada a uma baixa produção de IFN- γ (MAIOLI et al., 2004). Em 2007, Pinheiro e Rossi-Bergmann verificaram que apesar de camundongos C57BL/6 IFN- γ ^{-/-} apresentarem lesões iniciais similares ao seu controle selvagem, após 2 meses os animais deficientes foram incapazes de controlar a lesão e apresentaram maior carga parasitária, com maiores níveis de IL-4 e menores de IL-12 e TNF- α , demonstrando a importância de uma resposta Th1 nesse modelo experimental. A presença da citocina IL-10 também está relacionada a progressão da doença em C57BL/6 infectados com *L. (L.) amazonensis*, visto que camundongos C57BL/6 IL10^{-/-} apresentaram níveis de 3 a 10 vezes maiores de IL-12 e IFN- γ (JI et al., 2003). Dessa forma, o modelo murino utilizando a espécie *L. (L.) amazonensis* parece ser o mais adequado para representar as características da leishmaniose tegumentar humana, visto que a resposta imune observada está associada a um padrão misturado Th1/Th2 (PEREIRA; ALVES, 2008).

1.4. Tratamento das leishmanioses

O tratamento das leishmanioses é baseado na farmacoterapia, visto a ausência de vacina para essas enfermidades em humanos. O arsenal quimioterápico para as leishmanioses incluem medicamentos como antimoniais pentavalentes, anfotericina B, pentamidina, paramomicina e miltefosina, este último sendo o único administrado oralmente (SINGH et al., 2016).

1.4.1. Antimoniais Pentavalentes

Os antimoniais pentavalentes (Sb^V) são as drogas de primeira escolha a mais de 70 anos para o tratamento das leishmanioses tegumentar e visceral

(OUELLETTE et al., 2004; SINGH et al., 2016). Comercialmente, existe duas formulações de SbV disponíveis: o Antimoniato de N-metil glucamina ou Antimoniato de meglumina (Glucantime®), distribuído principalmente nos países de língua francesa e espanhola, e o Gluconato de antimônio (V) sódico ou estibogluconato de sódio (Pentostan®), distribuído nos países de língua inglesa (RATH et al., 2003; SINGH et al., 2016).

No Brasil, a formulação utilizada de primeira escolha é o Glucantime®. A recomendação da Organização Mundial de Saúde é que as doses deste antimonial não ultrapasse 20mg/Kg/dia. No Brasil, para tratamento das formas cutâneas recomenda-se dose de 10-20mg de Sb^V/kg/dia, durante 20-30 dias seguidos (BRASIL, 2007), e para o tratamento da forma visceral, 20mg Sb^V/kg/dia durante 20 a 40 dias (BRASIL, 2006). As aplicações devem ser feitas por via parenteral, intramuscular ou endovenosa, com repouso após a aplicação, visto que não possui efeito pela via oral. Artralgia, mialgias, dores abdominais, hepatite, pancreatite e distúrbios cardiológicos são efeitos colaterais frequentemente associados ao uso desta droga (FRÉZARD et al., 2009; SINGH et al., 2016), e por isso, torna-se necessário a internação do paciente para um tratamento mais seguro.

Apesar de décadas de uso, o mecanismo de ação dos antimoniais ainda não é compreendido em sua totalidade. Sabe-se que o Sb^V são convertidos para sua forma trivalente (Sb^{III}), mais tóxicas, sendo esta redução realizada no interior do macrófago e também do parasita, o que torna os antimoniais pentavalentes uma pró-droga (OUELLETTE et al., 2004; FRÉZARD et al., 2014; SINGH et al., 2016). Observou-se que a conversão da forma pentavalente para a forma trivalente pode ocorrer de forma enzimática, mediada pelas enzimas tiol dependente redutase (TDR)1 e a antimoniato redutase (ACR2) ou por reações não enzimáticas, através da presença dos tiols glutatona e da tripanotona (FRÉZARD et al., 2014; SINGH et al., 2016), sendo a taxa da conversão não enzimática maior em baixo pH, o que mimetiza o vacúolo parasitóforo onde está a amastigota (FERREIRA et al., 2003).

Dentre os principais mecanismos de ação observados para os antimoniais temos a inibição dos processos metabólitos que geram ATP, incluindo a glicólise

e β -oxidação das amastigotas, e a alteração nos níveis de tiols (sistema de defesa antioxidante do parasita), tanto pela inibição da enzima tripanotiona redutase quanto do efluxo dos tiols tripanotiona [T(SH)₂] e glutathiona (GSH), aumentando assim a susceptibilidade do parasita ao estresse oxidativo (FRÉZARD et al., 2014; SINGH et al., 2016). Foi observado que os antimoniais também induzem fragmentação de DNA e morte celular por apoptose no parasita (SERENO et al., 2001; LEE et al., 2002; SUDHANDIRAN; SHAHA, 2003). Além dos efeitos diretos sobre o parasita, os antimoniais também possuem efeito imunomodulador devido ao aumento da produção de citocinas, ROS e NO (PATHAK; YI, 2001; MUNIZ-JUNQUEIRA; PAULA-COELHO, 2008).

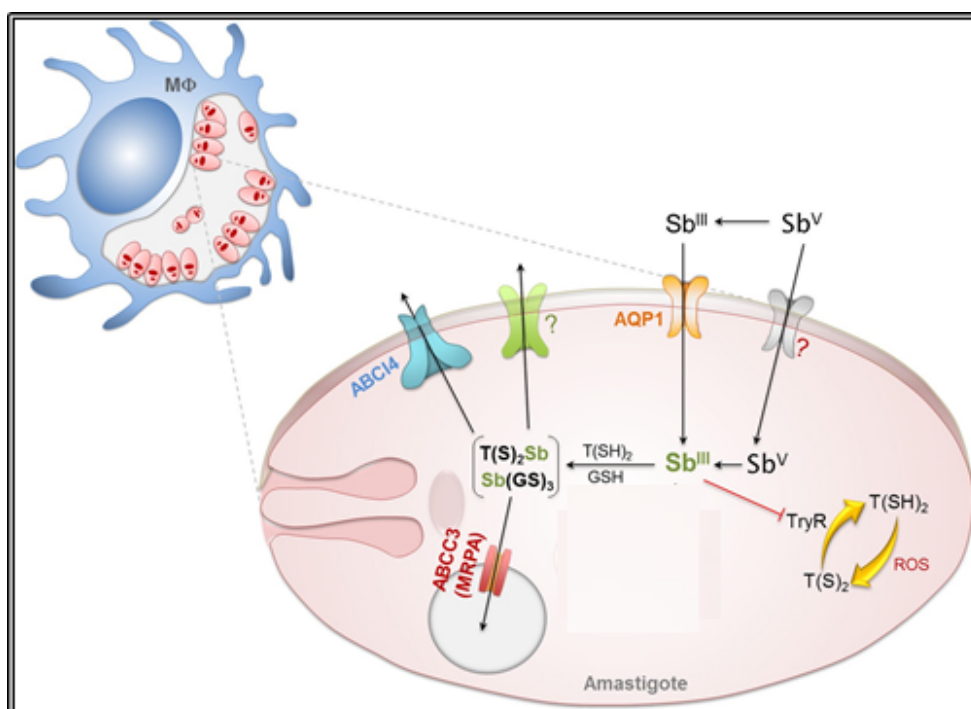
O surgimento de parasitas resistentes aos antimoniais pentavalentes vêm ocorrendo em vários locais do mundo, sendo os principais relatos na Índia desde 1990, principalmente devido a má utilização deste fármaco. Observou-se que no Estado de Bihar, na Índia, existe uma alta taxa de falha no tratamento dos pacientes com leishmaniose (cerca de 60%) com os antimoniais pentavalentes, sendo observado o surgimento de cepas resistentes nessa região endêmica (SUNDAR et al. 2012; FRÉZARD, 2014). Além do mal uso, a presença do metal arsênico na água neste local têm sido associado com o surgimento de cepas resistentes aos antimoniais (SINGH et al., 2016).

Estudos relacionados a resistência ao antimônio em *Leishmania* indicam que diversos mecanismos moleculares podem ocorrer no parasita para conferir esse fenótipo (FRÉZARD et al., 2014). Dentre os principais mecanismos relacionados a resistência em um patógeno temos a diminuição da absorção ou aumento do efluxo do fármaco, diminuição da ativação do fármaco, caso seja uma pró-droga, alteração no complexo receptor-fármaco e aumento no reparo ao dano causado pelo fármaco (SINGH, 2006).

Na figura 8 estão demonstradas as principais propriedades farmacológicas (metabolismo, transporte e processamento intracelular) dos antimoniais. Em parasitas do gênero *Leishmania*, já foi observado que o antimonial trivalente entra no parasita através do transportador denominado AQP1 (*aquaglyceroporin 1*) (GOURBAL et al. 2004), sendo o transporte da forma pentavalente ainda desconhecido (FRÉZARD et al. 2014). A deleção ou expressão reduzida desse

transportador, resultando em um menor influxo de Sb^{III} no parasita, já foi observado em linhagens resistentes ao antimônio (Figura 8) (MARQUIS et al. 2005; MUKHERJEE et al. 2013; RAI et al. 2013; MONTE-NETO et al., 2015).

Figura 8 – Principais propriedades farmacológicas de drogas antimoniais.



Fonte: Adaptado de FRÉZARD et al., 2011. Ilustração do metabolismo, transporte e processamento intracelular do antimônio em *Leishmania*. O antimônio pentavalente (Sb^{V}) pode ser reduzido para sua forma trivalente (Sb^{III}) tanto no macrófago quanto no interior do parasita, onde se associa a tióis como tripanotona ($\text{T}(\text{SH})_2$) e glutatona (GSH) formando conjugados tiol-metal que podem sofrer efluxo ou sequestro para interior de vesículas através de transportadores ABC (ABC14 , MRPA). O antimônio age inibindo a enzima tripanotona redutase (TryR), principal responsável pelo equilíbrio redox em *Leishmania*. $\text{M}\Phi$ – macrófago; AQP1 – aquagliceroporina 1; ROS – espécies reativas de oxigênio.

Uma vez dentro do parasita, o Sb^{III} conjuga-se principalmente com os tióis $\text{T}(\text{SH})_2$ e GSH , formando conjugados que podem sofrer efluxo ou serem sequestrados para o interior de vesículas através de transportadores da superfamília ABC (*ATP-binding cassette transporters*). Em culturas de células resistentes ao antimônio, verificou-se uma maior expressão do transportador ABC

denominado MRPA (*multidrug resistance-associated protein A*), identificado em vesículas intracelulares e relacionados ao sequestro do complexo Sb^{III} -tiol (MUKHERJEE et al. 2007; MONTE-NETO et al., 2011; RAI et al. 2013). A presença de transportadores ABC na membrana plasmática também foi observada tanto em linhagens clínicas resistentes ao Sb^{V} (RAI et al., 2013) como em cepas cuja resistência foi induzida em laboratório (MANZANO et al. 2013), demonstrando a contribuição desse tipo de transportador no fenótipo de resistência em *Leishmania*. Outra modificação frequentemente observada em *Leishmania* resistentes ao antimonial é a superexpressão de enzimas envolvidas na biossíntese de tiols, como a ornitina descarboxilase (ODC) e a γ -glutamilcisteína sintetase (γ -GSC), resultando em uma maior produção de tiols, diminuição da concentração de Sb^{III} livre e extra-proteção contra o estresse oxidativo (MUKHERJEE et al. 2007; MONTE-NETO et al., 2011; FRÉZARD et al. 2014)

Uma recente problemática associada a resistência a drogas em *Leishmania* vêm sendo sua correlação com o estado fisiológico do parasita. Estudos recentes com linhagens clínicas de *L. (L.) donovani* resistentes ao Sb^{V} verificaram que esses parasitas apresentam maior capacidade de gerar formas metacíclicas, assim como maior poder de infecção *in vitro* e *in vivo* (OUAKAD et al., 2011; VANAERSCHOT et al., 2010; VANAERSCHOT et al., 2011), demonstrando dessa forma que o impacto da resistência a drogas pode ter consequências ainda maiores em parasitas do gênero *Leishmania*.

Além dos antimoniais, drogas de segunda escolha têm sido empregadas no tratamento das diversas formas da leishmaniose, entre as quais se destacam a pentamidina, anfotericina B[®], miltefosina e paramomicina, particularmente úteis em casos refratários ou de resistência aos antimoniais.

1.4.2. Pentamidina

A pentamidina é uma diamina que se mostra altamente eficaz para casos de leishmaniose visceral (RATH et al., 2003). O mecanismo de ação desta droga

nos parasitas está associado com a inibição da biossíntese de poliaminas, ligação ao seu DNA do cinetoplasto do parasita e inibição do potencial de membrana mitocondrial (CROFT et al., 2006; SINGH et al., 2016). A inibição do complexo da cadeia respiratória mitocondrial (especialmente o complexo II) em promastigotas de *L. (L.) donovani* resulta em estresse oxidativo (produção de ROS), alterações nos níveis de cálcio intracelular e apoptose desses parasitas, sendo estes mecanismos associados à ação da pentamidina (MEHTA; SHAHA, 2004). A pentamidina também inibe a topoisomerase II levando a uma despolarização no potencial de membrana mitocondrial do parasita, seguido pela liberação do citocromo c e fragmentação de DNA em *L. (L.) panamensis* e *L. (L.) donovani* (CORTAZAR et al., 2007; SINGH; DEY, 2007). Esse fármaco também é administrado por via parental, na dose de 2-4mg/kg em dias alternados por um período de 3 – 5 semanas (SINGH et al., 2016). No entanto, a alta toxicidade desta droga também é fator limitante para o uso. Dentre os efeitos adversos relacionados com seu uso temos náusea, vômito, hipotensão, alterações cardiológicas, nefrotoxicidade, *diabetes mellitus* dependente de insulina irreversível, e até mesmo, morte repentina (SINGH et al., 2016).

1.4.3. Anfotericina B

A anfotericina B[®] (AmB) é um antibiótico e antifúngico escolhido como a droga de segunda escolha para o tratamento das leishmanioses no Brasil, especialmente em casos de pacientes que não responderam ao tratamento com Glucantime[®] (BRASIL, 2007). Na Índia, devido aos casos de resistência ao antimonial pentavalente nos casos de LV, ela é utilizada como droga de primeira escolha (SINGH et al., 2016). O mecanismo de ação do AmB em *Leishmania* está relacionado a uma interação com determinados esteróis da membrana plasmática desses organismos, o ergosterol, tendo como consequência uma alteração de sua permeabilidade, com a formação de poros, o que induz o parasita à morte (OUELLETTE et al., 2004; CROFT et al., 2006; SINGH et al., 2016). Lee e colaboradores (2002) também verificaram que o tratamento de formas

promastigotas e amastigotas axênicas de *L. (L.) donovani* induziu morte celular programada por apoptose *in vitro*.

A anfotericina B (AmB) é administrada via intravenosa como uma suspensão com desoxicolato, sendo recomendado a dose de 0,75-1mg/kg administrado com 5% de dextrose, sendo 15 injeções em dias alternados durante 30 dias (SINGH et al., 2016). Embora seja bastante eficiente, a AmB também é tóxica e associada a sérios efeitos colaterais. Dentre eles podemos destacar febre alta, dores, náusea, vômito, dispnea, nefrotoxicidade e baixo teor de potássio após infusões intravenosas repetidas (SINGH et al., 2016). Novas associações dessa droga a lipossomas reduzem significativamente sua toxicidade e efeitos colaterais, porém, o alto custo de sua formulação é um fator limitante para o uso desses medicamentos, especialmente nos países em desenvolvimento (OUELLETTE et al., 2004; CROFT et al., 2006; SINGH et al., 2016).

Adicionalmente, casos recentes de relapso e resistência a esse fármaco vêm questionando o futuro desse medicamento na terapia da LV, visto que os isolados resistentes a AmB apresentam baixa concentração deste fármaco em seu interior, aumento na expressão do gene que codifica o transportador de resistência a múltiplas drogas (MDR - *multidrug resistance protein*) 1 e de 7-8 vezes maior CI_{50} quando comparada a linhagem sensível (SRIVASTAVA et al., 2011; PURKAIT et al., 2012)

1.4.4. Miltefosina

A Miltefosina vem apresentando resultados positivos no tratamento das leishmanioses, e, diferentes dos demais tratamentos, sua administração é pela via oral. Esse fármaco pertence a classe das alquilfosfocolinas, sendo inicialmente utilizado como agente antitumoral (SINGH et al., 2016). Seu mecanismo de ação ainda não é bem conhecido, contudo, acredita-se estar associado com inibição da biossíntese de fosfatidilcolina e no metabolismo alquil-lipídios, alterando a composição fosfolipídica do parasita (OUELLETTE et al., 2004; SINGH et al.,

2016). Em formas promastigotas de *Leishmania* foi observado que esta droga altera os níveis de cálcio intracelular (SERRANO-MARTIN et al., 2009a) e induz morte celular por apoptose (PARIS et al., 2004; VERMA; DEY, 2004).

No que se refere ao tratamento de leishmaniose visceral, a miltefosina foi associada a uma cura de 95% com boa tolerância dos pacientes (JHA et al., 1999), no entanto, para LTA a eficácia de cura ficou entre 53 e 91%, dependendo da espécie de *Leishmania* (SOTO et al., 2004). Sua administração é por via oral com dose diária de 50-200 mg/kg durante 28 dias, sendo os principais efeitos colaterais distúrbios gastrointestinais em cerca de 35-50% dos pacientes, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade e teratogenicidade (SINGH et al., 2016). Estudos recentes vêm demonstrando casos de reincidência e resistência associados a esse fármaco, tendo como mecanismos associados a resistência a alteração no transporte da droga para o interior do parasita e superexpressão de transportadores ABC, alertando assim para sua utilização no tratamento das leishmanioses (CROFT et al., 2006; SINGH et al., 2016).

1.4.5. Paramomicina

Paramomicina é um antibiótico aminoglicosídico utilizado em diversas infecções, como giardíase, amebíase e criptosporidíase. Sua administração é por via parenteral em infecções sistêmicas de LV (11 mg/kg/dia por 21 dias) e como pomada para o tratamento de lesões cutâneas na LT (SINGH et al., 2016). Esse fármaco age inibindo a síntese de proteína do parasita, através da ligação às subunidades dos ribossomos e causando uma leitura errada do RNA mensageiro, além de interferir na fluidez de membrana, metabolismo lipídico e potencial de membrana mitocondrial da *Leishmania* (JHINGRAN et al., 2009; MAAROUF et al., 1997). Apesar da alta taxa de cura após tratamento com esse fármaco, a terapêutica com 21 injeções parenteral foi associada a diversos efeitos colaterais como hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e ototoxicidade (SINGH et al., 2016). Resistência associada a paramomicina em linhagens de *L. (L.) donovani* geradas

em laboratório revelam significativa superexpressão de transportadores ABC e efluxo da droga (BHANDARI et al., 2014).

Nesse contexto, onde os tratamentos apresentam uma toxicidade significativa e efeitos colaterais importantes, além do surgimento de cepas resistentes, destacamos a importância da proposta da Organização Mundial de Saúde que recomenda pesquisas que visam à busca de novos fármacos para o tratamento das leishmanioses.

1.5. O Ácido Ascórbico

O ácido ascórbico, também conhecido como vitamina C, é uma lactona que possui fórmula molecular $C_6H_8O_6$ e peso molecular de 176,12. No século XVIII, o médico escocês James Lind foi o primeiro a correlacionar a alta mortalidade em marinheiros ingleses devido ao escorbuto com a deficiência dessa vitamina, sendo esta molécula isolada pela primeira vez na década de 1920 pelo bioquímico e ganhador do prêmio Nobel Albert Von Szent Györgyi (IQBAL; KHAN; KHATTAK, 2004; CHEN et al., 2015).

O ácido ascórbico é antioxidante hidrossolúvel, instável e facilmente oxidado, degradando-se na presença de oxigênio, altas temperaturas e substâncias alcalinas (IQBAL; KHAN; KHATTAK, 2004). Em meio aquoso essa molécula se ioniza liberando um próton, passando a se chamar ascorbato, podendo ser completamente oxidado ao deidroascorbato (IQBAL; KHAN; KHATTAK, 2004; CHEN et al., 2015). Vários mamíferos são capazes de sintetizar a vitamina C, contudo o ser humano não a sintetiza, sendo necessário obtê-la a partir da ingestão exógena para o cumprimento das funções fisiológicas normais.

A presença do ácido ascórbico é necessário para o funcionamento das células em seres humanos, visto que ele atua como cofator de várias enzimas, como por exemplo a lisil e a prolil hidroxilases, enzimas presentes na biossíntese do colágeno (MAY; QU, 2005a). O ácido ascórbico também participa da síntese e

modulação de alguns componentes hormonais do sistema nervoso, como a hidroxilação de dopamina e noradrenalina, além de influenciar na biodisponibilidade do ferro, já que o mantém na forma reduzida (Fe^{2+}), estimulando sua absorção (IQBAL; KHAN; KHATTAK, 2004).

O ácido ascórbico também é importante para o sistema imunológico, visto que modula a atividade de fagócitos, linfócitos e monócitos (CHEN et al. 2015). Verificou-se que a incubação da vitamina C com macrófagos foi capaz de proteger essas células do estresse oxidativo gerado pela fagocitose de *beads* de látex (MAY et al., 2005b). Além de proteger contra o estresse oxidativo, a vitamina C foi capaz de estimular diversas funções dos macrófagos como aderência, quimiotaxia e fagocitose (DEL RIO et al., 1998), além de aumentar a produção de NO em macrófagos estimulados com LPS/IFN- γ , por aumentar a expressão da enzima iNOS (MIZUTANI et al., 1998). Dessa forma, verificou-se que o uso da vitamina C durante infecções causadas por vírus, bactérias e protozoários muitas vezes alivia ou previne essas infecções (HEMILA, 2017).

Devido a sua ação antioxidante, o ácido ascórbico vem sendo associado a diversas drogas com o objetivo de diminuir a toxicidade desses fármacos (SHARMA; SEHGAL; KAUR, 2012; LONGCHAR; PRASAD, 2015; WU et al., 2015; CHEN et al., 2015). Em modelo experimental de leishmaniose visceral, observou-se que o uso do antineoplásico cisplatina com os antioxidantes vitamina C e vitamina E reduziu a nefrotoxicidade desse fármaco em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) donovani* (SHARMA; SEHGAL; KAUR, 2012). Em 2014, Kato e colaboradores verificaram o efeito hepatoprotetor do ácido ascórbico associado ao Sb^V sobre camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) infantum*, onde observou-se uma diminuição no índice de células em apoptose e atividade da peroxidase nos hepatócitos desses animais. O efeito protetor do ácido ascórbico também foi observado em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) infantum* e tratados com a associação do Sb^{III} lipossomal e ácido ascórbico, tanto em tecido renal quanto hepático (CASTRO et al., 2014). De fato, já foi observado que a ingestão profilática apenas do ácido ascórbico diminuiu a carga parasitária de hamsters infectados com *L. (L.) donovani* (Garg et al., 2004), demonstrando o efeito benéfico dessa vitamina em modelo experimental de leishmaniose.

1.6. Produtos Naturais e os Lignoides

As plantas são uma fonte importante de produtos naturais biologicamente ativos, muitos dos quais constituem modelos moleculares para a síntese de um grande número de fármacos. Essas moléculas encontradas na natureza revelam uma gama de diversidade em termos de estrutura e de propriedades físico-químicas e biológicas (BRESOLIN; FILHO, 2003), de forma que a atividade antileishmania de diversas plantas já vem sendo relatada na literatura (CARVALHO; FERREIRA, 2001; ROCHA, et al. 2005; AHUA et al., 2006; BRAGA et al., 2007; DUTTA et al., 2008).

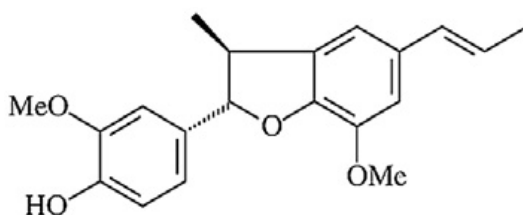
Dentre as diversas classes de metabólitos secundários pode-se citar os lignoides, que são moléculas caracterizadas por apresentarem um esqueleto formado exclusivamente pelo grupo fenilpropânico ($C_6 - C_3$) $_n$, sendo n restrito a poucas unidades. Os lignoides são uma classe abundante de produtos naturais, que subdividem-se nos seguintes grupos: *lignanas*, *neolignanas*, *alolignanas*, *norlignanas*, *oligolignoides* e *heterolignoides*. As neolignanas são dímeros formados pelo acoplamento oxidativo de alil fenóis e de proprenil fenóis, entre si ou cruzados, que não apresentam o carbono gama oxigenado (BARBOSA-FILHO, 2004).

A atividade antileishmania de várias neolignanas vem sendo observada nos últimos anos. Em 1998, Costa observou a atividade antileishmania de nove neolignanas sintéticas em macrófagos infectados *in vitro* com *L. (L.) donovani*. Também foi observada a atividade de sete neolignanas isoladas de *Ocimum sanctum*, sobre formas promastigotas de *L. (L.) major* (SUZUKI et al., 2009). Em 2000, Barata e colaboradores verificaram que as neolignanas surimensina (isolada de *Virola surinamensis*) e 3,4,5-trimetoxi-8-[3',5'-dimetoxi-4'-(E)-propenilfenoxi]-fenilpropano (isolada de *Virola pavanis*), além de sete análogos sintéticos, foram ativas sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) donovani*. Outros estudos demonstraram que 17 dentre 22 neolignanas sintéticas possuíam atividade anti-amastigota sobre macrófagos infectados com *L. (L.) donovani* e/ou *L. (L.) amazonensis* (AVENIENTE et al., 2007). Recentemente,

observou-se a atividade da neolignana eupomatenóide-5, ativa sobre formas promastigotas, amastigotas axênicas e sobre macrófagos infectados com a espécie *L. (L.) amazonensis* (VENDRAMETTO et al., 2010).

A licarina A (Figura 9) é uma neolignana extraída principalmente de vegetais pertencentes aos taxa Magnoliales, Laurales e Piperales (BARBOSA-FILHO, 2004), como por exemplo, das espécies *Nectandra glabrescens* (Lauraceae) (BARBOSA-FILHO et al., 1989) e *Magnolia ovata* (Magnoliaceae) (BARROS et al., 2009). Contudo, verificou-se na literatura que sua síntese é viável, sendo este processo simples e rápido, características essas importantes para uma possível comercialização industrial (CHIOCARRA et al., 1993; NASCIMENTO et al., 2000).

Figura 9 – Representação da neolignana licarina A.



Fonte: Nérís et al., 2013.

A síntese da licarina A é realizada pelo acoplamento oxidativo do (*E*)-isoeugenol, na presença de peroxidase, resultando em uma mistura racêmica das moléculas (+)-licarina A e (-)-licarina A, ou (±)-licarina A, que podem ser posteriormente isoladas (CHIOCARRA et al., 1993; NASCIMENTO et al., 2000). Recentemente, a síntese da licarina A utilizando a aplicação da patente PI 1101946-8, denominada “Processo oxidativo de biocatalizador utilizando água de coco de *Cocos nucifera* como meio de reação e fonte de peroxidase”, demonstrou-se enantioseletiva para a síntese da (-)-licarina A (NÉRIS et al., 2013), não formando assim a mistura racêmica (±)-licarina A.

Estudos farmacológicos com linhagens tumorais demonstraram que a licarina A induz a apoptose da linhagem celular HL-60 devido ao aumento da

atividade da caspase-3 (células leucêmicas promielóides humana), produzindo um padrão de fragmentação de DNA típico de células em apoptose (PARK et al., 2004). Outros estudos demonstraram que esta neolignana inibe de modo dose-dependente a enzima phospholipase cy1 (envolvida na regulação da proliferação celular), além de apresentar atividade antiproliferativa nas linhagens de células cancerígenas A549 (carcinoma pulmonar humano), MCF-7 (adenocarcinoma mamário humano), HCT-15 (adenocarcinoma de cólon humano) (LEE et al. 2004), e citotóxica para as linhagens P-388 (leucemia murina), KB16 (carcinoma epidermóide da nasofaringe humano), A549 (adenocarcinoma do epitélio de pulmão humano) e HT-29 (adenocarcinoma de cólon humano) (TSAI et al., 1999). Verificou-se que a licarina A apresenta efeitos neuroproterores contra a neurotoxicidade induzida por glutamato em cultura de células corticais de ratos (MA et al., 2005), e também que ela induz a atividade anabólica no metabolismo ósseo, pois sua presença (5 μM) induziu a diferenciação de osteoblastos (LEE et al., 2009). Em 2010, León-Díaz e colaboradores observaram que a licarina A possui atividade antimicrobiana sobre diversas cepas de *Mycobacterium tuberculosis*, apresentando valores de CIM (concentração inibitória mínima) entre 3,12 a 12,5 $\mu\text{g/mL}$, e sobre outras espécies do gênero *Mycobacterium*, dentre elas, *M. avium*, *M. chelonae*, *M. fortuitum* e *M. smegmatis* (MICs de 3,12 a 6,25 $\mu\text{g/mL}$).

Abe e colaboradores (2002) observaram que a licarina A possui atividade *in vitro* contra formas epimastigotas de *T. cruzi*, apresentando uma MC_{100} (concentração mínima na qual todos os parasitas se tornam imóveis) de 123 $\mu\text{g/mL}$ após 48 horas de exposição. Recentemente, também foi observada sua atividade antichagásica pela inibição no crescimento de formas epimastigotas ($\text{CI}_{50}/96\text{h}$ 462,7 μM) e de tripomastigotas ($\text{CI}_{50}/24\text{h}$ 960 μM) de *T. cruzi* (CABRAL et al., 2010). Neste último estudo, verificou-se que a licarina A provocou desorganização celular e alterações em diversas organelas na forma epimastigota, como por exemplo, desorganização das cristas mitocondriais, condensação e desorganização do kDNA, da cromatina nuclear, desconexão entre as 2 camadas da membrana perinuclear, além de apresentar uma enorme quantidade de autofagossomos (CABRAL et al., 2010). Em 2011, Pereira e colaboradores demonstraram *in vitro*, a atividade da mistura racêmica sintética

(±)-Licarina A e de seus enantiômeros isolados, (+)-Licarina A e (-)-Licarina A, sobre os parasitas *Schistosoma mansoni* e *Trypanosoma cruzi*. Verificou-se que tanto a mistura racêmica quanto os enantiômeros isolados foram ativos sobre vermes adultos de *S. mansoni*, sendo a (±)-Licarina A mais ativa, seguida pelo enantiômero (-) (PEREIRA et al., 2011). Já sobre tripomastigotas de *T. cruzi*, a (-)-Licarina A apresentou-se mais ativa (CI₅₀ de 23,46 µg/mL), seguida pelo enantiômero (+) e pela mistura racêmica (PEREIRA et al., 2011).

Estudos de farmacocinética *in vitro* demonstraram que a licarina A (mais especificamente o enantiômero (+) ou “*deidrodiisoeugenol*”) possui uma absorção moderada em modelo de monocamadas de células Caco-2 (linhagem celular de adenocarcinoma de cólon humano) (YANG et al., 2010). No modelo *in vivo* de ratos Sprague-Dawley foi observado que a neolignana apresenta meia-vida de distribuição e meia-vida de eliminação de 26,8 ± 0,4 e 389,1 ± 76,3 minutos após administração intravenosa (LI; YANG, 2008a), com concentração inicial maior no fígado e no cérebro desses animais (LI; YANG, 2008b). Estudos de metabolismo recentes verificam a presença de nove metabólitos em microssomos de fígado (*in vitro*), fezes e urina de rato (*in vivo*) após tratamento com a (+)-licarina A (LI; YANG, 2011), sendo esta eliminada principalmente pelas fezes dos animais (LI; YANG, 2012).

Com relação a atividade antileishmania, inicialmente nosso grupo de pesquisa verificou uma significativa atividade da licarina A isolada da espécie *Nectandra glabrescens*, sobre formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi* (CALDAS, 2010), associada a uma baixa citotoxicidade sobre células de mamíferos (CALDAS, 2010; NÉRIS et al., 2013). Utilizando a neolignana licarina A sintetizada, confirmou-se a sua atividade sobre *L. (L.) amazonensis* (CI₅₀ 17,46 µg/mL) e *L. (L.) chagasi* (CI₅₀ 9,83 µg/mL) além de também apresentar-se efetiva sobre promastigotas de *L. (L.) major* (CI₅₀ 9,59 µg/mL) e *L. (L.) brasiliensis* (CI₅₀ 13,26 µg/mL). Dependendo da espécie de *Leishmania*, esta atividade antipromastigota foi associada a perturbações nos níveis de cálcio intracelular e/ou morte celular por apoptose/necrose (NÉRIS, 2012).

Trabalhos realizados pelo nosso grupo de pesquisa demonstraram que a neolignana licarina A apresenta atividade sobre formas amastigotas das espécies

analisadas *L. (L.) major* (CE₅₀ de 4,71 µg/mL) e *L. (L.) chagasi* (CE₅₀ de 7,91 µg/mL), apresentando-se mais ativa sobre esta forma evolutiva do parasita. Esta atividade foi associada a uma ação imunomoduladora da licarina A no modelo de infecção com *L. (L.) major*, visto que o tratamento reduziu a produção das citocinas IL-6 e IL-10, citocinas associadas a uma resposta Th2, sendo independente da produção de óxido nítrico (NÉRIS, 2012; NÉRIS et al., 2013). Em um estudo preliminar *in vivo* com camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis*, verificamos que a licarina A apresenta um efeito protetor na visceralização da doença pela redução na carga parasitária do baço dos animais tratados com a dose de 20 mg/kg/dia. Contudo, uma dose maior (100 mg/kg/dia) foi associada a efeitos tóxicos nesses animais (NÉRIS, 2012).

Dessa forma, considerando essas potencialidades reveladas da neolignana licarina A, torna-se oportuno ampliar e aprofundar os estudos da atividade desta neolignana sobre *L. (L.) amazonensis*, investigando a sua ação *in vitro* sobre as formas promastigotas e amastigotas do parasita, sobre linhagem de *L. (L.) amazonensis* resistentes ao Sb^{III}, assim como o seu efeito em associação com o ácido ascórbico na terapêutica da leishmaniose tegumentar experimental.

2 OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Estudar a atividade antileishmania da neolignana licarina A em modelos murinos de infecção *in vitro* e *in vivo* com *L. (L.) amazonensis* sensível e resistente ao antimonial trivalente.

2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a atividade antileishmania da licarina A sobre formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis*;
- Investigar a atividade antileishmania da licarina A sobre macrófagos murinos infectados *in vitro* com *L. (L.) amazonensis*;
- Selecionar formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* resistentes ao antimonial trivalente e estudá-las quanto ao perfil de crescimento, perfil de metilação do DNA, atividade de transportadores ABC e virulência em modelos de infecção *in vitro* e *in vivo*
- Verificar a atividade da licarina A sobre formas promastigotas, amastigotas axênicas e amastigotas intracelulares de *L. (L.) amazonensis* resistente ao antimonial trivalente;
- Estudar o efeito da associação de licarina A e ácido ascórbico sobre a infecção de camundongos *Swiss* com *L. (L.) amazonensis*;
- Analisar os aspectos histológicos das patas dos camundongos *Swiss* infectados experimentalmente com *L. (L.) amazonensis* e tratados com a associação licarina A e ácido ascórbico;

- Investigar a atividade imunomoduladora do co-tratamento da licarina A e ácido ascórbico em camundongos Swiss infectados experimentalmente com *L. (L.) amazonensis*;
- Avaliar os parâmetros toxicológicos dos animais infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com a associação licarina A e ácido ascórbico;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

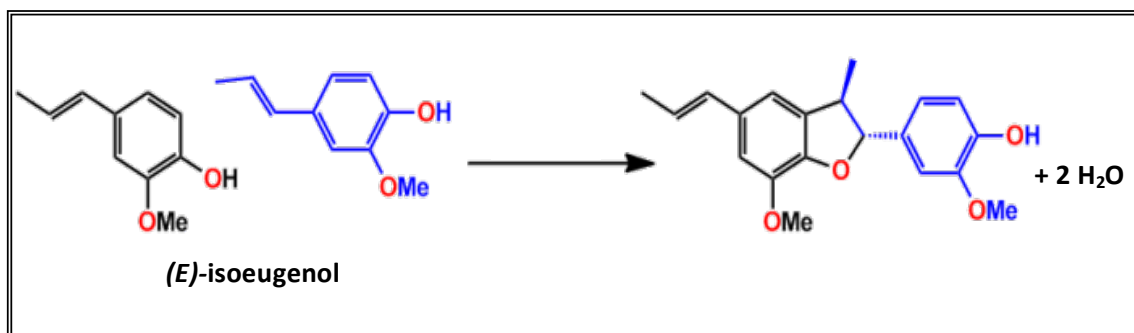
3.1. Síntese da neolignana licarina A

A síntese da neolignana licarina A foi realizada no Centro de Biotecnologia (CBIotec), da Universidade Federal da Paraíba (UFPB), e supervisionada pelo prof. Dr. Luiz Cesar Rodrigues. Esta síntese foi realizada pela dimerização oxidativa do fenilpropanóide (*E*)-isoeugenol, sendo esta reação catalisada pela enzima peroxidase, que irá converter os fenóis em radicais fenoxil na presença de peróxido de hidrogênio (H_2O_2), seguindo então a formação das ligações carbono-carbono e carbono-oxigênio (Figura 10).

A síntese da licarina A utilizada segue a metodologia realizada por Nérís et al., 2013. Como meio reacional e fonte da enzima peroxidase foi utilizada água de coco verde, fruto da planta *Cocos nucifera*, coletadas na cidade de João Pessoa – PB. Para a síntese da licarina A, inicialmente, água de cinco cocos verdes (*Cocos nucifera*) foram coletadas e o volume total foi aferido (2,8 L), sendo este filtrado através de mecha de algodão em funil de vidro. Sob agitação constante, foi adicionado à água de coco uma solução de 4 g de (*E*)-isoeugenol em 200mL de metanol (CH_3OH). Em seguida, adicionou-se lentamente 55,2 mL de solução de peróxido de hidrogênio 10V (Farmax[®]), por gotejamento durante 4 horas. A reação foi mantida sob agitação constante por uma hora. Adicionou-se à reação 1,5L de diclorometano (CH_2Cl_2), e após 10 minutos sob agitação, transferiu-se a mistura para um funil de separação. Esta mistura foi extraída por três vezes com solvente diclorometano, e as fases diclorometanos reunidas foram secas com sulfato de magnésio anidro ($MgSO_4 \cdot 7H_2O$), sendo em seguidas filtradas para eliminar o sulfato sólido. Por fim, os solventes foram submetidos à evaporação a 55°C sob pressão reduzida (rotavapor), e o resíduo resultante foi purificado através de cromatografia de coluna de sílica gel, usando como eluente Hexano/Acetato de Etila (EtOAc) 8:2. Obteve-se 2,4 gramas de produto (60% de rendimento).

Toda a reação foi monitorada por cromatografia líquida em camada delgada utilizando como eluente uma solução de Hexano/AcOEt 8:2, e para detecção, lâmpada UV 254nm. O produto foi submetido à ressonância magnética nuclear (RMN) de ^1H e ^{13}C , sendo identificado como a neolignana licarina A (ANEXO A).

Figura 10 – Reação de síntese da Licarina A.



Fonte: modificado de <<https://sites.google.com/a/ltf.ufpb.br/luiscezar/>>. Para a síntese da neolignana, utilizou-se o (E)-isoeugenol como substância de partida, água oxigenada (H₂O₂) como agente oxidante, e a água de coco com fonte natural da enzima peroxidase, sendo esta a catalizadora da reação. Temperatura ambiente, 3h, 2,4g.

3.2.Preparação das soluções da neolignana licarina A e do ácido ascórbico

Para os testes *in vitro*, a licarina A foi pesada (20mg) e diluída em 1mL dedimetilsulfóxido [DMSO (CH₃)₂SO – Vetec, Brasil] sob agitação em Vortex (DaiggerVortex Genie 2, A. Daigger & Co., Inc), obtendo-se assim uma solução estoque de 20 mg/mL. Antes de cada experimento, foram feitas soluções de trabalho de 2 mg/mL, pela diluição da solução estoque no próprio meio de cultura (Schneider ou RPMI 1640). A concentração final de DMSO não ultrapassou 0,5%, e esta concentração não apresentou citotoxicidade para as células utilizadas (NÉRIS et al., 2013; AMORIM et al., 2013). Nos experimentos *in vivo*, a neolignana foi diluída em tampão fosfato salina [PBS (NaCl 145 mM, Na₂HPO₄ 9 mM NaH₂PO₄ 1 mM, pH 7,4)] e 0,05% de Tween 80 para a administração da dose de 50 mg/kg/dia. O ácido ascórbico (Farmace Indústria

Químico-Farmacêutica Cearense Ltda) foi diluído em PBS para administração da dose de 200 mg/kg/dia.

3.3. Parasitas e manutenção das culturas *in vitro* e *in vivo*

As formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) foram cultivadas, *in vitro*, em meio de cultura bifásico ágar-sangue, “Novy-Macneal-Nicolle” (NNN), associado ao meio líquido Schneider, suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de antibiótico estreptomicina e penicilina (100 µg/mL; 100 U.I./mL) (Schneider completo). As células foram incubadas a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ em estufa *Biochemical Oxygen Demand* (B.O.D.) e repicados semanalmente para manutenção da viabilidade celular, sendo utilizada para experimentação com no máximo 15 passagens *in vitro*.

A cultura de *L. (L.) amazonensis* também foi mantida *in vivo*, pela inoculação de 1×10^7 promastigotas/mL (40 µL) em fase estacionária de crescimento, no coxim plantar da pata posterior de camundongos (*Mus musculus*), linhagem Swiss. Os camundongos Swiss foram provenientes da Unidade de Produção Animal – UPA localizada no Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos – IPeFarM/UFPB, e mantidos à $21 \pm 1^\circ\text{C}$ e ciclo claro escuro de 12 h com água e ração *ad libitum* na UPA/IPeFarM/UFPB. Todos os protocolos experimentais que utilizaram animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal da Paraíba (CEUA/UFPB Nº 0211/12 - ANEXO B).

Além da manutenção *in vitro* e *in vivo*, formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* também foram criopreservadas para futuras utilizações. Para isto, adicionou-se 10% de glicerol estéril nas culturas de promastigotas no início da fase estacionária de crescimento, cultivadas apenas em meio Schneider completo. O glicerol foi adicionado lentamente à cultura sob agitação constante, e após 15 minutos, alíquotas de 1 mL foram distribuídas em tubos apropriados para criopreservação, e mantidas em freezer a -80°C e em nitrogênio líquido. Conforme necessidade, essas culturas eram descongeladas à temperatura

ambiente, observadas no microscópio comum, e uma alíquota de cerca de 200 μ L era inoculada em 1 mL de meio Schneider completo e incubadas em estufa a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ para o crescimento das culturas.

3.4. Seleção de *L. (L.) amazonensis* resistentes ao antimonial trivalente

A seleção da linhagem resistente ao antimônio trivalente (Sb^{III}) foi realizada de acordo com Liarte e Murta (2010). Inicialmente, as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram cultivadas em meio Schneider completo contendo a concentração do antimonial trivalente correspondente a CI_{50} (13,5 $\mu\text{g/mL}$) da cultura de *L. (L.) amazonensis*. O aumento gradual da concentração da droga foi realizada apenas quando a cultura exposta ao Sb^{III} apresentava uma taxa de crescimento semelhante a cultura selvagem (sensível ao Sb^{III}). Esse aumento gradual da concentração do Sb^{III} foi realizado até as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* crescerem em meio de cultura contendo a concentração de 15x CI_{50} (202,5 $\mu\text{g/mL}$). Paralelamente, a cultura selvagem (sensível ao Sb^{III}) foi repicada sem a presença do antimonial, para garantir o mesmo número de passagens *in vitro* (FRADE, 2016).

3.5. Obtenção das formas amastigotas axênicas *in vitro*

As formas amastigotas axênicas foram obtidas a partir da diferenciação das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* de acordo com Rodrigues e colaboradores (2015). Inicialmente, formas promastigotas em fase estacionária de crescimento (5 dias de cultivo em meio Schneider completo) foram centrifugadas durante 10 minutos a $112 \times g$ [2000 rpm (centrífuga PARSEC CT0603)], lavadas três vezes com salina fosfatada tamponada PBS estéril e ressuspensas em meio Schneider, pH 5,5, suplementado com 5% de SFB e 1% de penicilina/estreptomicina 10.000 UI/10 mg/mL. As células foram mantidas em estufa de B.O.D. a 32°C durante três dias para diferenciação em formas

amastigotas, sendo diariamente agitadas e passadas em agulhas 26G^{1/2} para desagregação dos grumos celulares. Antes de cada experimento, as células foram analisadas sob microscopia óptica quanto a sua morfologia típica de amastigotas.

Para a transformação da cultura resistente ao Sb^{III}, formas promastigotas foram cultivadas durante seis dias em meio Schneider completo contendo 202,5 µg/mL de Sb^{III} até a fase estacionária de crescimento, onde foram centrifugadas durante 10 minutos a 112 x g [2000 rpm (centrífuga PARSEC CT0603)], lavadas três vezes com salina fosfatada tamponada PBS estéril e ressuspensas em meio Schneider, pH 5,5, suplementado com 5% de SFB e 1% de penicilina/estreptomicina 10.000 UI/10 mg/mL. As células foram mantidas em estufa de B.O.D. a 32°C durante dois dias para diferenciação em formas amastigotas, sendo analisadas antes de cada experimento.

3.6.Avaliação da atividade antileishmania da licarina A sobre formas promastigotas de *Leishmania sp.*

Para avaliação da atividade antipromastigota, foram utilizadas duas metodologias, utilizando o teste do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-zil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT – Amresco, Ohio, EUA) e a quantificação direta em câmara de Neubauer sob microscopia óptica comum.

Para o teste com MTT, foram utilizadas culturas de *L. (L.) amazonensis* com até 15 passagens *in vitro*. Para isso, formas promastigotas (1x10⁶ células por poço) em fase logarítmica de crescimento foram cultivadas em placas de 96 poços na presença e ausência da licarina A durante 24 horas à 25°C ± 1. Após esse tempo, foi adicionado 10 µL de MTT (5mg/mL) e após 4 horas, 50 µL de uma solução de SDS (dodecil sulfato de sódio) a 10% para diluição dos cristais de formazan. No dia seguinte, foi realizada a leitura da placa em espectrofotômetro (Biotek modelo ELx800) à 540 nm. Os resultados foram expressos em porcentagem de citotoxicidade e em valores de CE₅₀, sendo a cultura controle (ausência de droga) considerado como 100% de viabilidade dos parasitas.

Nos ensaios com as linhagens sensíveis e resistente ao Sb^{III}, formas promastigotas em fase logarítmica (1×10^6 células/mL) foram cultivadas em tubos de ensaio contendo meio Schneider completo e diferentes concentrações da licarina A (exceto no controle, que continha apenas o meio Schneider). Após 72 horas de incubação a $25^\circ\text{C} \pm 1$, alíquotas das culturas foram retiradas, diluídas em solução de isoton (10,5 g de ácido cítrico, 7 g de NaCl, 15 mL de formol em 1 L de água destilada), analisadas sob microscopia óptica comum e quantificadas diretamente em câmara de Neubauer. A estimativa do número de parasitos/mL de cultura foi feita utilizando a fórmula: N° de parasitos = média dos 4 quadrantes x o inverso da diluição da amostra x 10^4 (AMORIM et al., 2013). Os resultados foram expressos em porcentagem de inibição de crescimento em valores de concentração inibitória de 50% do crescimento de formas promastigotas (CI₅₀), sendo a cultura controle considerada como 0% de inibição do crescimento dos parasitos.

Paralelamente, as culturas de *L. (L.) amazonensis* foram avaliadas quanto à sensibilidade ao Glucantime[®] [300 mg/mL (Aventis Pharma, Brasil)], à Anfotericina B[®] [1 mg/mL (Cristália, COD 21.1184.v/08)] e ao antimonial trivalente como drogas de referência. As substâncias foram diluídas em meio Schneider completo, de acordo com as concentrações testadas (NÉRIS et al., 2013). Os medicamentos Glucantime[®] e Anfotericina B[®] foram cedidos gentilmente pelo Hospital Universitário Lauro Wanderley-UFPB, e o antimonial trivalente pelo Dr. Rubens Monte-Neto (Centro de Pesquisas René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte - MG).

3.7. Avaliação da atividade antileishmania da licarina A sobre formas amastigotas axênicas

Formas amastigotas axênicas (1×10^6 células/poço) foram cultivadas em meio Schneider completo pH 5.5 na ausência (controle) e presença de diferentes concentrações da licarina A em um volume final de 100 µL, durante 24 horas à 32°C . Em seguida foi adicionado 10 µL de MTT (5 mg/mL) e após 4 horas, 50 µL

de SDS 10%. No dia seguinte, a placa foi analisada em espectrofotômetro (Biotek modelo ELx800) à 540 nm. Paralelamente, as culturas de *L. (L.) amazonensis* também foram avaliadas quanto à sensibilidade ao Glucantime® (300mg/mL), à Anfotericina B® (1mg/mL) e ao antimônio trivalente. As substâncias foram diluídas em meio Schneider completo de acordo com as concentrações testadas. O mesmo protocolo foi realizado para as culturas sensíveis e resistentes ao Sb^{III} (RODRIGUES, 2017). Os resultados foram expressos em porcentagem de citotoxicidade e em valores de concentração efetiva sobre 50% dos parasitas (CE₅₀), sendo a cultura controle (crescimento na ausência de droga) considerado como 100% de viabilidade dos parasitas.

3.8.Avaliação da atividade da licarina A sobre macrófagos murinos infectados *in vitro* com *Leishmania (L.) amazonensis*

3.8.1. Coleta de macrófagos peritoneais de camundongos Swiss

Camundongos Swiss fêmeas com 8 a 10 semanas de idade provenientes da UPA/IpeFarM/UFPB foram utilizados para coleta de macrófagos peritoneais. Os animais foram mantidos à 25 ± 1°C e ciclo claro escuro de 12 h com água e ração *ad libitum*. Os camundongos foram elicitados através da inoculação de 1mL de tioglicolato (Gibco) na cavidade peritoneal. Após 5 dias, os animais foram sacrificados através de deslocamento cervical e os macrófagos coletados através da injeção de 10 mL de PBS suplementado com 3% de SBF na cavidade peritoneal do animal, sendo esta solução recuperada em seguida e transferida para tubos de polipropileno, onde foram centrifugadas durante 10 minutos a 111 x g (1000 rpm [Centrífuga Parsec CT0603]). O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 1mL de meio RPMI 1640 suplementado de 10% de SBF e antibiótico (estreptomicina a 100 µg/mL e penicilina a 100 U/mL) (RPMI completo). Essas células foram então quantificadas em câmara de Neubauer, na presença do corante vital Azul de Tripán a 0,4%, que é permeável apenas em células mortas, permitindo assim a distinção de células viáveis das não viáveis.

3.8.2. Atividade da neolignana licarina A sobre amastigotas intracelulares

Após a coleta dos macrófagos peritoniais de camundongos Swiss (item 3.8.1), as células foram ajustadas para 5×10^5 células/mL com meio RPMI completo, sendo 1 mL dessa suspensão distribuídos em placas de 24 poços, contendo cada poço uma lamínula estéril de 13 mm de diâmetro. As placas foram incubadas em estufa de 5% de CO₂ a 37°C por 2 horas, para que os macrófagos pudessem aderir na lamínula. Durante o período de incubação, culturas de promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, em fase estacionária de crescimento, foram centrifugadas por 10 minutos a 447 x g (2000 rpm [Centrífuga Parsec CT0603]). O sobrenadante foi descartado, as células ressuspensas em 1 mL de RPMI completo e quantificadas em câmara de Neubauer. Após 2 horas, foram inoculadas 5×10^6 promastigotas/mL em cada poço (proporção de 10 promastigotas/ 1 macrófago), e incubadas novamente por 3 horas em estufa de 5% de CO₂ a 37°C. Após este tempo, cada poço da placa de cultura foi lavado 3 vezes com PBS suplementado com 3% de SBF pré-aquecido a 37°C, para que as células não aderidas e não internalizadas fossem removidas, colocando no fim de cada lavagem 1 mL de RPMI completo. Posteriormente, as substâncias testes foram adicionadas nos poços em diferentes concentrações (exceto nos controles) e as placas recolocadas em estufa de 5% de CO₂ a 37°C, durante 24 e 72 horas. Para os experimentos de virulência utilizando as linhagens sensível e resistente ao Sb^{III}, não foi adicionada nenhuma droga nesta etapa, ficando as culturas apenas com meio RPMI completo durante 24 e 72 horas.

Após os tempos determinados, todas as lamínulas foram coradas com o corante Panótico (Newprov[®], Brasil) e montadas em lâminas permanentes com o uso de entelan. As análises das lamínulas foram realizadas em microscopia óptica comum (aumento total: 1000x), onde foram quantificados cerca de 300 macrófagos por lamínula, analisando a quantidade de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófago infectado.

3.8.3. Determinação dos níveis de óxido nítrico

Os sobrenadantes provenientes dos ensaios de infecção de macrófago com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (descrito no item anterior) foram testados quanto à produção de nitrito pela reação de Griess, como uma medida da produção de óxido nítrico (GREEN et al., 1982).

Para análise, em cada amostra de sobrenadante (100 µL) foi adicionado 100µL do reagente de Griess [1% de sulfanilamida e 0,1% de N-(1naftil)-dihidrocloreto etilenodiamina em 2,5% de H₃PO₄]. A concentração de nitrito foi calculada baseada em uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂) estabelecida por um padrão de nitrito cuja concentração variava de 1 mM até 0.0078 mM. Após 5 minutos de incubação a temperatura ambiente, a densidade óptica foi mensurada por espectrofotometria (leitor de ELISA) com comprimento de onda de 540nm.

3.8.4. Detecção de citocinas através de ensaio imunoenzimático (ELISA)

Os sobrenadantes provenientes dos ensaios de infecção de macrófago com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram analisados quanto à presença das citocinas TNF-α, IFN-γ, IL-12, IL-6 e IL-10, de acordo com o protocolo especificado no Kit do fabricante (eBIOSCIENCE[®], Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA).

Inicialmente, placas de ELISA (NUNC-Immuno[™]) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura (anti-TNF-α, anti-IFN-γ, anti-IL-12, anti-IL-6 e anti-IL-10) e incubadas por 18 horas a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (SIGMA[®] Chemical Co., U.S.A) e os sítios inespecíficos foram bloqueados com a solução de bloqueio (PBS contendo 10% de SBF) durante uma hora. Após este tempo, as placas foram novamente lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20, sendo então adicionadas as amostras a

serem analisadas e os padrões (diferentes concentrações) das citocinas recombinantes TNF- α (7,55pg/mL a 1000pg/mL), IFN- γ (15,1 a 2000 pg/mL pg/mL), IL-12 (15,1 pg/mL a 2000 pg/mL), IL-6 (7,55 pg/mL a 1000 pg/mL) e IL-10 (31,25 pg/mL a 4000 pg/mL) para a realização da curva. As placas foram novamente incubadas por 18 horas (*overnight*) à 4°C.

Após este tempo, as placas foram lavadas e o complexo detector, formado pelo anticorpo de detecção biotinilado, foi adicionado às placas, sendo estas incubadas por uma hora. Em seguida, as placas foram novamente lavadas, adicionou-se o complexo enzimático avidina-peroxidase (avidin-HRP) e incubou-se novamente a temperatura ambiente por meia hora. Após lavagens adicionais, a reação foi revelada pela adição da solução substrato contendo tetrametilbenzidina (TMB) e peróxido de hidrogênio, e após 5 minutos, a reação foi interrompida com ácido sulfúrico 1N. A leitura das placas foi realizada em leitor de microplaca (MICROPLATE READER versão Max, BN 2529 Molecular Devices) a 450 nm. As quantidades de citocinas foram calculadas a partir das curvas-padrão.

3.9. Curva de crescimento de *L. (L.) amazonensis* resistente ao antimonial trivalente

As culturas de *L. (L.) amazonensis* sensível e resistente ao Sb^{III} foram cultivadas em Enlarmeyers contendo meio Schneider completo, com inóculo inicial de 1×10^6 células/mL. A cada 24 horas, alíquotas foram retiradas, diluídas em solução de isoton (10,5 g de ácido cítrico, 7 g de NaCl, 15 mL de formol em 1 L de água destilada), analisadas sob microscopia óptica comum e quantificadas diretamente em câmara de Neubauer. A estimativa do número de parasitos/ mL de cultura foi feita utilizando a fórmula: N° de parasitos = média dos 4 quadrantes x o inverso da diluição da amostra x 10^4 (AMORIM et al., 2013). Este procedimento foi realizado durante sete dias, determinando assim as fases logarítmica e estacionária de crescimento.

3.10. Análise do perfil de infecção *in vitro* de *L. (L.) amazonensis* resistente ao antimonial trivalente

Para análise da virulência *in vitro*, macrófagos peritoneais de camundongos *Swiss* foram coletados como descrito no item 3.8.1. A infecção foi realizada semelhante ao descrito no item 3.8.2, diferindo apenas no tempo de crescimento das culturas. A linhagem resistente ao Sb^{III} apresentou como melhor dia de infecção o sexto dia de crescimento durante a padronização, e a linhagem sensível o quinto dia de crescimento, semelhante a linhagem de *L. (L.) amazonensis* selvagem com baixo número de repiques.

3.11. Análise do perfil de infecção *in vivo* de *L. (L.) amazonensis* resistente ao antimonial trivalente

Para os estudos *in vivo* foram utilizados camundongos *Swiss* fêmeas de 8 a 10 semanas provenientes da UPA/IpeFarM/UFPB. Os camundongos foram infectados com 1×10^7 promastigotas/40µL de formas promastigotas das culturas sensível e resistente de *L. (L.) amazonensis* em fase estacionária de crescimento (quinto e o sexto dia de crescimento para a linhagem sensível e resistente, respectivamente). Os animais foram infectados pela via subcutânea na pata posterior direita (BARRAL-NETO et al., 1996; TIUMAN et al., 2012) e foram monitorados semanalmente durante 17 semanas, por meio de medidas da espessura da pata infectada e não infectada com o auxílio de um paquímetro, onde a diferença entre as medidas representou o tamanho da lesão. Parâmetros clínicos qualitativos e quantitativos também foram analisados durante o tratamento, dentre eles alterações de peso corporal, onde a pesagem foi realizada semanalmente, além da queda de pelo e presença de metástase.

3.12. Avaliação da carga parasitária

Ao final do experimento *in vivo*, todos os animais foram eutanasiados e a parasitemia da pata e linfonodo poplíteo direito, foram avaliados através do método de diluição seriada (OLIVEIRA et al., 2005). Um fragmento da lesão da pata de cada animal foi removido, pesado e macerado em meio Schneider completo (2 mL) com um macerador de tecido, até formar uma suspensão homogênea. Processo semelhante foi realizado com linfonodo poplíteo que drenou a lesão, contudo, a solução do linfonodo foi obtida com a utilização do órgão completo. As suspensões celulares (200 µL) foram então transferidas para placas de 96 poços, e em seguida, realizou-se diluições sucessivas em meio Schneider completo até 10^{-21} . A análise das culturas ocorreu após 14 dias de incubação em estufa B.O.D. a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ sob microscópio invertido (Wiloverts, Hund Wetzlar), para verificar a presença de formas promastigotas de *Leishmania*. Após o sétimo dia na estufa, foi adicionado 100 µL de Schneider completo em cada poço, para proporcionar o crescimento efetivo dos parasitas. Cada amostra foi analisada em triplicata.

3.13. Análise da atividade de transportadores ABC em *L. (L.) amazonensis* resistentes ao antimonial trivalente

Para análise da atividade dos transportadores ABC em cepas de *L. (L.) amazonensis* sensível e resistente ao Sb^{III} , foi utilizado o substrato Rho- (Rhodamina) 123 (SIGMA[®] Chemical Co., U.S.A.) e os bloqueadores Rev 205 [(reversina 205 - (SIGMA[®] Chemical Co., U.S.A.)) e MK571 (SIGMA[®] Chemical Co., U.S.A.), inibidores específicos dos transportadores PgP e MRP, respectivamente (SHAROM et al., 1999; GEKELER et al., 1995). Inicialmente, formas promastigotas das culturas sensível e resistente em fase logarítmica de crescimento foram centrifugadas por 10 minutos a $447 \times g$ (2000 rpm [Centrífuga Parsec CT0603]) e ressuspensas em PBS estéril gelado. Em seguida, foi

adicionado 1×10^6 promastigotas/500 μ L em tubos FACs e as células foram então tratadas ou não (controle) com os bloqueadores Rev 205 (10 μ M) ou MK571 (10 μ M) durante 30 minutos. Após esse tempo, foi adicionado o substrato Rho-123 (500 nM) durante 30 minutos, e as amostras foram então avaliadas por citômetro de fluxo BD FACSCalibur. Antes de cada análise (15 min antes) as células foram marcadas com iodeto de propídeo [PI (1 μ g/mL)- (SIGMA[®] Chemical Co., U.S.A.)] para avaliação da viabilidade celular. Para análise, o registro de 10.000 células foi adotado, utilizando o programa Cellquest (Bencton-Dickinson). Os ensaios foram realizados em triplicata, sendo realizados três experimentos independentes.

3.14. Análise do nível de metilação global de *L. (L.) amazonensis* resistente ao antimonial trivalente

3.14.1. Extração de DNA de *L. (L.) amazonensis*

A extração de DNA de *Leishmania* foi realizada através do método clorofórmio/fenol (SAMBROOK et al., 1989). Inicialmente, as culturas sensível e resistente ao Sb^{III} (2mL), em fase logarítmica e estacionária de crescimento, foram centrifugadas a 6610 x g [9000 rpm (Microcentrifuga MCD 2000-HT)] durante 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Em seguida, adicionou-se 300 μ L de Tampão de Lise [Tris HCl 1M pH 8,0 (Invitrogen Co. CA); EDTA 0,5 M pH 8,0 (SIGMA[®] Chemical Co., U.S.A); SDS 10% (SIGMA[®] Chemical Co., U.S.A) em água miliQ estéril] e 10 μ L proteoquinase k (SIGMA[®] Chemical Co., U.S.A) a 20 mg/mL. Essa solução foi incubada em banho-maria (Nova Ética- 316D) *overnight* a 37°C. No dia seguinte, adicionou-se 300 μ L de fenol, os tubos foram submetidos à agitação por 5 minutos e centrifugados a 8161 x g [10000 rpm (Microcentrifuga MCD 2000-HT)] por 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, onde foi adicionado 300 μ L de Clorofórmio:Álcool isoamílico (24:1) e mantidos sob agitação durante 5 minutos. Em seguida, os tubos foram centrifugados a 8161 x g [10000 rpm (Microcentrifuga MCD 2000-HT)] por 2 minutos, sendo a fase aquosa removida para um novo tubo. Este procedimento foi

repetido duas vezes. Por fim, adicionou-se 500 µL de etanol gelado (2,5 vezes o volume) e 30 µL de acetato de sódio (NaAc 3M) em cada tubo, e deixados para precipitação do material genético durante 24 horas a -20°C. No dia seguinte, o material foi centrifugado a 11752 x g [12000 rpm (Microcentrífuga MCD 2000-HT)] por 20 minutos, o sobrenadante descartado e os pellets formados foram secos a temperatura ambiente. Após a secagem total da amostra, a mesma foi ressuspensas em 50 µL de água milliQ estéril e incubadas a -20°C até a sua utilização.

Após a extração, observou-se a necessidade de tratamento das amostras com a enzima RNase (Ribonuclease A). Dessa forma, adicionou-se 50 µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH. 8,0; EDTA 1 mM) e 10 µg/mL de RNase (SIGMA® Chemical Co., U.S.A) em todas as amostras, sendo incubadas a 37°C por uma hora. Após este tempo, adicionou-se 300 µL de etanol gelado e 15 µL de acetato de sódio (3M). Após 24 horas de precipitação, o material foi novamente centrifugado a 11752 x g [12000 rpm (Microcentrífuga MCD 2000-HT)] durante 20 minutos, o material seco e ressuspensado em 50µL de água milliQ estéril. As amostras foram estocadas a -20°C até sua análise. A concentração e o grau de pureza do DNA extraído das culturas sensível e resistente de *L. (L.) amazonensis* foi estimada por espectrofotômetro (Thermo Scientific NanoDrop 2000).

3.14.2. Avaliação do nível de metilação global de *L. (L.) amazonensis*

A avaliação do nível de metilação global foi realizada com a utilização do Kit MethylFlash Global DNA Methylation (5-mC) ELISA Easy Kit (Colorimetric) (Epigentek® Group Inc. Farmingdale, NY-USA). As amostras de DNA de *L. (L.) amazonensis* sensível e resistente ao Sb^{III} foram utilizadas na concentração de 100 ng, com grau de pureza 260/280 >1.6. Para controle positivo, amostras de DNA de *L. (L.) amazonensis* (800 ng) foram metiladas utilizando 1U da enzima CpG metiltransferase (M0226S, BioLabs), de acordo com as instruções do fabricante, obtendo-se assim o nível máximo de metilação (FARIAS et al., 2017).

A análise do nível de metilação global das amostras de DNA de *L. (L.) amazonensis* sensível e resistente ao Sb^{III} foi realizada de acordo com o protocolo especificado pelo Kit MethylFlash. Inicialmente, foi adicionado 100 µL de “*Binding Solution*” e 2,5 µL das amostras de DNA de *Leishmania* (40 ng/µL) em cada poço e incubados durante 1 hora a 37°C. O controle negativo conteve 100 µL de “*Binding Solution*” e 2,5 µL de água MilliQ. Em seguida, os poços foram lavados 3x com solução de lavagem (150 µL) sendo então adicionado o Complexo de Detecção 5-mc. Após 50 minutos a temperatura ambiente, os poços foram lavados 5x com solução de lavagem (150 µL), e foi adicionado 100 µL de “*Developer Solution*” para o desenvolvimento da cor azul na presença de DNA metilado (3-4 minutos). Para finalizar a reação, foi adicionado 100 µL de “*Stop Solution*”, sendo em seguida realizada a leitura da placa em leitor de microplaca (MICROPLATE READER versão Max, BN 2529 Molecular Devices) a 450nm.

3.15. Avaliação da atividade biológica da licarina A associada ao ácido ascórbico em camundongos Swiss infectados com *L. (L.) amazonensis*

3.15.1. Tratamento de camundongos Swiss infectados com *L. (L.) amazonensis*

Camundongos Swiss fêmeas de 8 a 10 semanas fornecidos pela UPA/IpeFarM/UFPB foram utilizados para os estudos da avaliação antileishmania *in vivo* da licarina A livre ou em associação com o ácido ascórbico. Inicialmente os animais foram separados em seis grupos (n=8), nos quais os grupos 2, 3, 4 e 5 receberam inicialmente o pré-tratamento com ácido ascórbico na dose de 200 mg/kg/dia durante 15 dias, pela via oral, e os grupos 1 e 6 receberam apenas o veículo constituído de PBS (veículo A), como demonstrado na tabela 1.

Com o fim do pré-tratamento, os animais dos grupos 1, 2, 3, 4 e 5 foram infectados com 1×10^6 promastigotas/40 µL de *L. (L.) amazonensis* em fase

estacionária de crescimento (cinco dias de cultivo), pela via subcutânea na pata posterior direita de cada animal (BARRAL-NETO et al., 1996; TIUMAN et al., 2012). O grupo 6 não foi infectado, sendo composto apenas por animais sadios.

Tabela 1. Protocolo de tratamento de camundongos *Swiss* infectados com *L. (L.) amazonensis*.

Grupos	Pré-tratamento	Tratamento
Grupo 1	Veículo A	Veículo B
Grupo 2	Ácido Ascórbico	Veículo B
Grupo 3	Ácido Ascórbico	Ácido Ascórbico
Grupo 4	Ácido Ascórbico	Ácido Ascórbico + Licarina A
Grupo 5	Ácido Ascórbico	Licarina A
Grupo 6*	Veículo A	Veículo B

Fonte: Elaboração própria. Camundongos *Swiss* foram pré-tratados com ácido ascórbico durante 15 dias, infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e em seguida tratados por sete semanas com ácido ascórbico, com ácido ascórbico + Licarina A ou apenas com Licarina A. Cada grupo foi composto de oito animais mantidos em ciclos de 12h claro/escuro e com livre acesso a ração e água. *Grupo 6 = animais sadios não infectados com *L. (L.) amazonensis*.

Após a infecção dos camundongos com parasitas de *L. (L.) amazonensis*, os animais receberam os seguintes protocolos de tratamento por via oral: Grupo 1: veículo B; Grupo 2: veículo B; Grupo 3: ácido ascórbico; Grupo 4: licarina A e ácido ascórbico; Grupo 5: licarina A (Tabela 1). O grupo 6 foi constituído de animais sadios não infectados que receberam apenas o veículo B, constituído de PBS + 0.05% Tween 80. Todas as substâncias avaliadas no tratamento foram diluídas no veículo B e o volume administrado em cada dose foi de 200 µL.

A administração do tratamento foi realizado diariamente durante sete semanas, e o desenvolvimento das lesões dos animais foi monitorado semanalmente durante esse período, por meio de medidas da espessura da pata infectada e não infectada com o auxílio de um micrômetro medidor de espessura (Mitutoyo Corporation, Tóquio, Japão), onde a diferença entre as medidas representou o tamanho da lesão. Foram também analisados durante o tratamento

parâmetros clínicos qualitativos que poderiam indicar uma possível toxicidade, dentre eles alterações de peso corporal, onde a pesagem foi realizada semanalmente, além da queda de pelo e presença de metástase.

3.15.2. Avaliação da carga parasitária após tratamento de camundongos Swiss infectados com *L. (L.) amazonensis*

Ao final do tratamento, um dia após a última administração, os animais foram submetidos a um jejum de 4 h e anestesiados com tiopental sódico (2 mg/animal – i.p., Thiopentax®/Cristália) e amostras de sangue foram coletadas pelo plexo orbital com o auxílio de uma agulha heparinizada (heparina sódica - Parinex® - Hipolabor) para análise dos parâmetros bioquímicos e hematológicos (item 3.15.5). Os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical, onde a pata foi coletada em formol para análise histológica (item 3.15.4) e a carga parasitária do linfonodo poplíteo direito e baço foram avaliados pelo método de diluição limitante (OLIVEIRA et al., 2005).

O linfonodo poplíteo e o baço de cada animal foi coletado e macerado em meio Schneider completo (2 mL) com um macerador de tecido, até formar uma suspensão homogênea. As suspensões celulares (200 µL) foram então transferidas para placas de 96 poços, e em seguida, realizou-se diluições sucessivas em meio Schneider completo até a diluição de 10^{-11} . A análise das culturas ocorreu após 14 dias de incubação em estufa B.O.D. a $25 \pm 1^\circ\text{C}$ sob microscópio invertido (Wiloverts, Hund Wetzlar), para verificar a presença de formas promastigotas de *Leishmania*. Após o sétimo dia na estufa, foi adicionado 100 µL de Schneider completo em cada poço, para proporcionar o crescimento efetivo dos parasitas. Cada amostra foi analisada em triplicata.

3.15.3. Análise de citocinas produzidas pelas células do linfonodo poplíteo

A suspensão celular obtida do macerado dos linfonodos poplíteos (item 3.15.2) foram centrifugadas por 10 min a 699 x g (2500 rpm), lavadas 3X em PBS estéril gelado e ressuspensas em meio RPMI completo. As células foram então quantificadas na presença do Azul de Tripán 0,4% e distribuídas em placas de 24 poços (1×10^6 células/mL). Para cada animal foram avaliados em duplicata células que não foram estimuladas (controle) e células que foram estimuladas com 50 µL de antígeno de *L. (L.) amazonensis*. As placas foram incubadas em estufa à 37°C e 5% de CO₂ por 72 horas, sendo em seguida as amostras congeladas para análise futura das citocinas IFN-γ e IL-10. As citocinas foram analisadas através do ensaio ELISA sanduiche conforme a técnica descrita no item 3.8.4.

O antígeno de *L. (L.) amazonensis* foi preparado previamente em nosso laboratório. Para isso, formas promastigotas em fase estacionária de crescimento foram centrifugadas por 10 min a 447 x g (2000 rpm) e lavadas 3 x em PBS estéril gelado, quantificadas em Câmara de Neubauer e ajustadas a uma concentração de 3×10^8 promastigotas/mL. A suspensão de parasitos foi então submetida a três ciclos de congelamento/descongelamento em nitrogênio líquido/37°C, obtendo-se, assim, os antígenos.

3.15.4. Análise histológica das patas infectadas dos camundongos Swiss

Apos a coleta das patas em formol 10%, as amostras passaram pelos seguintes processos para montagem da lamina histológica: descalcificação, desidratação, diafanização, impregnação, emblocagem, microtomia, pescaria, coloração e montagem da lâmina para análise e captura das imagens.

Inicialmente, o material histológico passou pelo processo de descalcificação, onde a amostra foi introduzida no líquido descalcificador com o volume igual ou superior a vinte vezes o volume da peça. A solução foi renovada diariamente e mantida em agitação durante 15 dias, sendo diariamente aferido o pH da solução e renovada a solução. Em seguida, o material histológico inserido em cassetes foram imergidos em soluções com concentração crescente de álcool etílico para o processo de desidratação. Ao final, o material foi imerso duas vezes no xilol com duração de 1 h cada imersão para o processo de diafanização ou clarificação.

O material histológico foi banhado duas vezes em parafina pré-aquecida, com cada banho de duração de 1 h (impregnação), sendo em seguida colocado em formas com parafina oriunda do seu dispensador para obtenção dos blocos (emblocagem). As amostras nos blocos foram então retiradas das formas, e foram seccionados pela navalha do micrótomo em cortes de aproximadamente 5µm de espessura. Os cortes foram levados ao banho-maria a uma temperatura em torno de 39 – 40°C. Com auxílio de uma lâmina, foi pescado o corte na fita de parafina no banho-maria, e as lâminas foram colocadas na estufa (60 °C) por 10 min para secagem. Com os cortes aderidos às lâminas, o processo de coloração foi realizado com o corante Hematoxilina-Eosina (HE) para análise da estrutura tecidual, grau de inflamação tecidual e migração de células inflamatórias.

Para a coloração com HE (hematoxilina-eosina), as lâminas foram inicialmente desparafinadas por imersão no xilol, durante 10 min, sendo hidratadas em álcool com concentrações decrescentes e posteriormente lavadas em água destilada. As lâminas foram imersas na hematoxilina por 30s, e em seguida, no corante eosina, por 5 minutos, e desidratadas com álcool a 80, 90 e 95% com duração de 1 minuto, cada imersão. As lâminas foram colocadas na estufa por 5 minutos para secagem. Após coloração, foi realizada a montagem das lâminas, onde uma lamínula foi colocada em cada lâmina com o bálsamo do Canadá inserindo sobre o corte. Depois, com auxílio de uma pinça, foram retiradas as bolhas e a lamínula foi comprimida com firmeza sobre o corte para o espalhamento do bálsamo. Após 24 h foram retirados os excessos do bálsamo para acabamento do preparo das lâminas e a captura das imagens.

As fotografias digitais foram capturadas pela câmera Moticam 5.0 MP acoplada a um microscópio óptico. As imagens foram calibradas no programa MOTIC PLUS em definições específicas conforme a objetiva utilizada: 10x ou 40x. A análise histológica foi realizada por um operador capacitado, que analisou qualitativamente os parâmetros histológicos para em seguida quantificá-los estatisticamente. Os dados foram analisados com o teste de Kruskal-Wallis e os parâmetros considerados para o cálculo da pontuação (escore histológico) foram infiltração celular e edema.

3.15.5. Avaliação dos parâmetros bioquímicos e hematológicos

Para a análise dos parâmetros bioquímicos (ureia, creatinina, aspartato aminotransferase - AST e alanina aminotransferase - ALT) o sangue foi submetido à centrifugação por 10 minutos a 3500 rpm para obtenção do plasma. Já para as análises hematológicas foi utilizado sangue total heparinizado e realizada avaliação das séries vermelha e branca (eritrograma e leucograma).

Os parâmetros bioquímicos e hematológicos foram determinados por meio de kits específicos utilizando-se o analisador bioquímico automático Cobas Mira Plus® (*Roche Diagnostic System*) e o analisador hematológico celular automático *Hematoclin 2.8 VET* (Bioclin®), respectivamente. As extensões sanguíneas foram coradas com corante panótico e analisadas em microscópio óptico, para realização da contagem diferencial de leucócitos.

3.16. Análise Estatística

Todos os experimentos *in vitro* foram realizados em pelo menos três ensaios independentes. Os dados obtidos foram comparados utilizando o teste “*t-student*” não pareado ou análises de variância ANOVA seguida pelo teste de Tukey para experimentos em grupo. Para realização da análise estatística e geração de gráficos, foi utilizado o programa GraphPadPrism 5.0. Apenas os valores de $p \leq 0,05$ foram considerados significativos. Para o cálculo de CI_{50} e CE_{50} , foi utilizado o modelo *Probit* de análise de regressão, utilizando o programa SPSS 13.0 for Windows. Os dados de citometria de fluxo foram analisados pelo programa FlowJo.

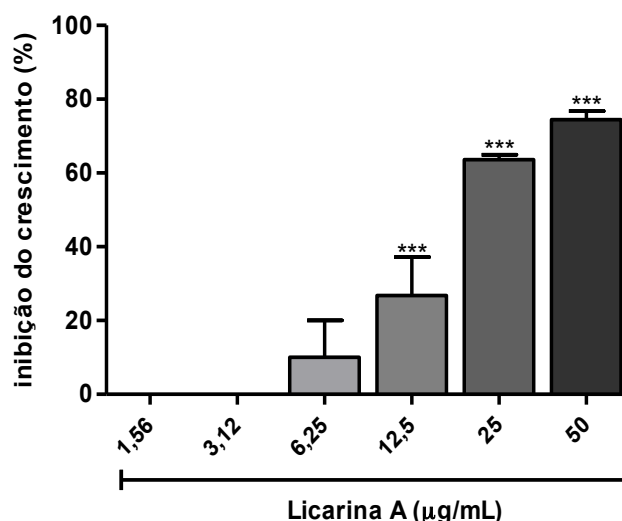
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Atividade antileishmania da licarina A sobre formas promastigotas *in vitro*

A licarina A apresentou atividade antileishmania sobre formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* a partir da concentração de 12,5 µg/mL, sendo esse percentual de inibição de $26,78 \pm 14,76\%$ (Gráfico 1). Com o aumento da concentração da molécula pode-se observar um aumento na inibição do crescimento desses parasitas, de forma que as concentrações de 25 e 50 µg/mL apresentaram inibições de crescimento de $63,66 \pm 1,81$ e $74,43 \pm 3,36\%$, respectivamente, em relação ao controle (0% de inibição de crescimento). Esses dados resultaram em uma CE_{50} de 22,13 µg/mL após 24h de tratamento com a neolignana.

Gráfico 1 – Inibição do crescimento das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* na presença de diferentes concentrações da Licarina A.



Fonte: Elaboração própria. As formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (1×10^6 células/mL) foram cultivadas em meio Schneider completo por 24 horas à 26°C, na presença da licarina A. Após 24h, a viabilidade celular foi analisada pelo método de MTT. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. Foi realizado o teste *t-student*, sendo $***p \leq 0,001$ em comparação ao controle.

Diversas neolignanas apresentam atividades sobre parasitas do gênero *Leishmania*, dentre elas destacam-se a atividade da burchelina e grandisina sobre promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) chagasi*, que apresentaram valores de CI_{50} de 15,96 $\mu\text{g/mL}$ e 11,82 $\mu\text{g/mL}$ sobre formas promastigotas, respectivamente (CALDAS, 2010). No ano de 2000, Barata e colaboradores verificaram que as neolignanas surimensina (isolada de *Virola surinamensis*) e 3,4,5-trimetoxi-8-[3',5'-dimetoxi-4'-(E)-propenilfenoxi]-fenilpropano (isolada de *Virola pavonis*), além de sete análogos sintéticos, foram ativas para formas promastigotas de *L. (L.) donovani* entre as concentrações de 30 e 100 μM . Suzuki e colaboradores (2009) analisando neolignanas isoladas de *Ocimum sanctum* verificaram que as mesmas foram ativas sobre formas promastigotas de *L. (L.) major*, com valores de CI_{50} entre 0,09 e 358,7 $\mu\text{g/mL}$. E no ano de 2010, analisando a neolignana eupomatenóide-5, Vendrametto e colaboradores observaram sua eficiência sobre formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (CI_{50} 32 $\mu\text{g/mL}$).

Com relação à neolignana licarina A, já foi observada sua atividade antiparasitária sobre formas epimastigotas (ABE et al., 2002; CABRAL et al., 2010) e tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* (CABRAL et al., 2010). A mistura racêmica ($\pm$)-licarina A e de seus enantiômeros isolados (+)-licarina A e (-)-licarina A sintetizados por Pereira e colaboradores (2011) também demonstraram, *in vitro*, atividade sobre vermes adultos de *Schistosoma mansoni* e sobre tripomastigotas de *T. cruzi*, na qual o enantiômero (-)-licarina A apresentou maior atividade (CI_{50} 23,46 $\mu\text{g/mL}$) sobre *T. cruzi* quando comparadas aos demais (PEREIRA et al., 2011).

Nosso grupo de pesquisa demonstrou a atividade da licarina A sobre diversas espécies do gênero de *Leishmania*. Caldas (2010) verificou a atividade antileishmania da licarina A isolada de *Nectandra glabrescens* sobre formas promastigotas de *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) amazonensis*, com $CI_{50/72h}$ de 11,82 e 15,96 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente. Em 2012, analisamos a atividade da licarina A sintetizada sobre quatro espécies de *Leishmania*, onde esta molécula apresentou-se ativa sobre todas elas, resultando em $CI_{50/72h}$ de 17,46; 9,59; 13,26 e 9,83 $\mu\text{g/mL}$ para as espécies *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) major*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (L.) chagasi*, respectivamente (NÉRIS, 2012). Neste último trabalho, observou-se

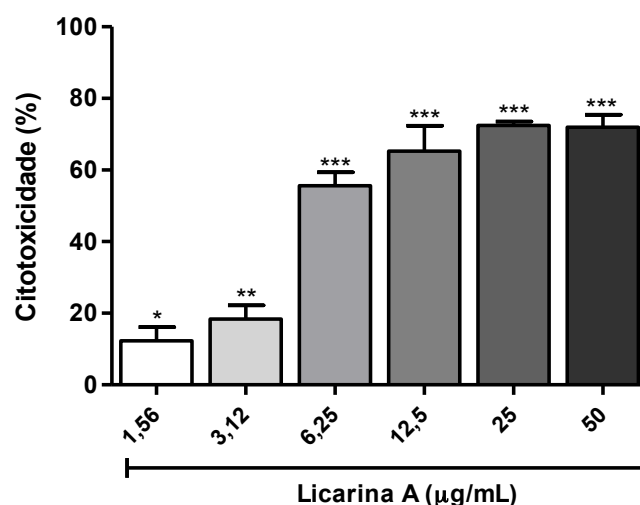
que esta neolignana promove uma perturbação nos níveis de cálcio intracelular nas formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) major*, além de induzir morte celular por mecanismo de apoptose/necrose em *L. (L.) amazonensis* e fragmentação do DNA genômico em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) major* (NÉRIS, 2012; NÉRIS et al., 2013).

No presente trabalho, o resultado de CI_{50} mais elevado observado para a licarina A sobre promastigotas de *L. (L.) amazonensis* deve-se principalmente a metodologia utilizada nos ensaios, visto que a quantificação direta em câmara de Neubauer sob microscopia óptica utilizada por Caldas (2010) e Nérís (2012) apresentou-se mais sensível quando comparada com a metodologia utilizando o MTT, como já observado no nosso grupo de pesquisa (MONTE-NETO et al., 2008). No entanto, como o ensaio com MTT foi a metodologia utilizada para os experimentos com amastigotas axênicas, ela foi adotada para melhor compararmos os resultados de atividade antipromastigota e antiamastigota da licarina A.

4.2. Atividade Antileishmania da licarina A sobre formas amastigotas axênicas *in vitro*

Com o objetivo de ampliar os conhecimentos da atividade antileishmania da licarina A, foi estudada a atividade desta neolignana sobre formas amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis*. Verificou-se que esta neolignana apresentou uma atividade significativa antiamastigota a partir da menor concentração analisada (1,56 $\mu\text{g/mL}$), onde esta concentração causou citotoxicidade de $12,25 \pm 6,6\%$ em relação ao controle (considerado como 100% de viabilidade) (Gráfico 2). A citotoxicidade ocorreu de maneira dependente de concentração para todas as concentrações analisadas, sendo essa morte celular de $18,37 \pm 6,58$; $5,61 \pm 6,5$; $65,3 \pm 12,27$; $72,42 \pm 1,9$ e $72,97 \pm 6,0\%$ para as concentrações de 3,12; 6,25; 12,5; 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, quando comparadas ao controle (Gráfico 2). Dessa forma, a licarina A apresentou uma CE_{50} de 10,78 $\mu\text{g/mL}$ após 24h de tratamento sobre formas amastigotas axênicas.

Gráfico 2 – Citotoxicidade da licarina A sobre formas amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis* na presença de diferentes concentrações.



Fonte: Elaboração própria. As formas amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis* (1×10^6 células/mL) foram cultivadas em meio Schneider completo por 24 horas à 26°C, na presença da licarina A. Após 24h, a viabilidade celular foi analisada pelo método de MTT. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. Foi realizado o teste *t-student*, sendo $*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$ e $***p \leq 0,001$ em comparação ao controle.

O desenvolvimento de culturas amastigotas axênicas para os ensaios que visam a descoberta de novas moléculas bioativas é de extrema importância, visto que esse é o estágio de vida do parasita *Leishmania* presente no hospedeiro vertebrado (DE MUYLDER et al., 2011).

A atividade antileishmania de algumas lignanas e neolignanas sobre amastigotas axênicas já foram demonstradas, como por Miert e colaboradores (2005), na qual diversos lignóides dihidrobenzofuranos apresentaram atividade antiamastigota, com valores de CI_{50} que variaram de 2,4 a >30 µg/mL sobre *L. (L.) donovani*. Em 2010, Cabanillas e colaboradores verificaram que quatro lignóides inéditos isolados de *Piper sanguineispicum*, denominadas sanguinolignanas A-D, também apresentaram atividade sobre formas amastigotas axênicas, com CI_{50} variando de $36,7 \pm 3,08$ à >130 µM, para a espécie *L. (L.) amazonensis*. Também no ano de 2010, Vendrametto e colaboradores observaram que a neolignana eupomatenóide-5, além de apresentar atividade antipromastigota, apresentou atividade sobre amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis* (CI_{50} 13 µg/mL).

Os resultados obtidos da atividade antipromastigota da licarina A resultaram em uma CI_{50} de 22,13 $\mu\text{g/mL}$ após 24h de tratamento com esta neoligana, como pode ser observado na tabela 2. Para as amastigotas axênicas, pode-se observar que a licarina A apresentou uma CE_{50} de 10,78 $\mu\text{g/mL}$ após 24h de tratamento (Tabela 2). Dessa forma, observou-se que a licarina A apresenta uma maior atividade antileishmania sobre formas amastigotas quando comparadas com as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, o que é bastante relevante visto que a forma amastigota é a forma presente no hospedeiro mamífero infectado (DE MUYLDER et al., 2011).

Tabela 2 - Concentração inibitória de 50% do crescimento (CI_{50}) de promastigotas e concentração efetiva de 50% (CE_{50}) de amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis* na presença da Licarina A, Antimoniato de Meglumina e Anfotericina B.

	Promastigotas (CI_{50})	Amastigotas (CE_{50})
Licarina A	22,13 $\mu\text{g/mL}$	10,78 $\mu\text{g/mL}$
Antimoniato de meglumina	> 8 mg/mL	1,01 mg/mL
Anfotericina B	0,72 $\mu\text{g/mL}$	0,21 $\mu\text{g/mL}$

Fonte: Elaboração própria.

Ao analisar a atividade antileishmania da droga antimoniato de meglumina (Glucantime[®]) verificou-se que esta apresentou CI_{50} > 8mg/mL e CE_{50} de 1,01 mg/mL para formas promastigotas e amastigotas axênicas, respectivamente (Tabela 2). Dessa forma, a licarina A apresentou-se mais efetiva tanto sobre as formas promastigotas quanto amastigotas axênicas quando comparados ao antimoniato de meglumina, droga de referência para o tratamento das leishmanioses no Brasil (BRASIL, 2006; BRASIL, 2007). Contudo, a baixa atividade antipromastigota do antimoniato de meglumina já é relatada na literatura (OUELLETE et al., 2004; CROFT et al., 2006). Isso porque o antimoniato de meglumina é amplamente considerado uma pró-droga em sua forma pentavalente, necessitando ser reduzido a sua forma trivalente para apresentar maior atividade antileishmania, redução esta que ocorre tanto dentro da

amastigota quanto dentro do próprio macrófago (HALDAR et al., 2011; FRÉZARD et al., 2014). Adicionalmente, verificou-se que este fármaco além de apresentar uma atividade direta sobre o parasita também possui atividade indireta, devido a sua ação imunomoduladora (OUELLETE et al., 2004; CROFT et al., 2006).

Já o fármaco anfotericina B apresentou valores de CI_{50} de 0,72 $\mu\text{g/mL}$ e CE_{50} de 0,21 $\mu\text{g/mL}$ sobre as formas promastigotas e amastigotas axênicas, respectivamente (Tabela 2), apresentando-se assim a droga mais efetiva dentre as substâncias analisadas. A expressiva atividade antileishmania *in vitro* da anfotericina B já é bem documentada na literatura, contudo, seus efeitos colaterais evidenciados após tratamento com este fármaco é um fator limitante para sua utilização (SINGH et al., 2016).

4.3. Avaliação da atividade biológica da licarina A sobre macrófagos murinos infectados com *L. (L.) amazonensis*

4.3.1. Atividade antileishmania da licarina A sobre amastigotas intracelulares

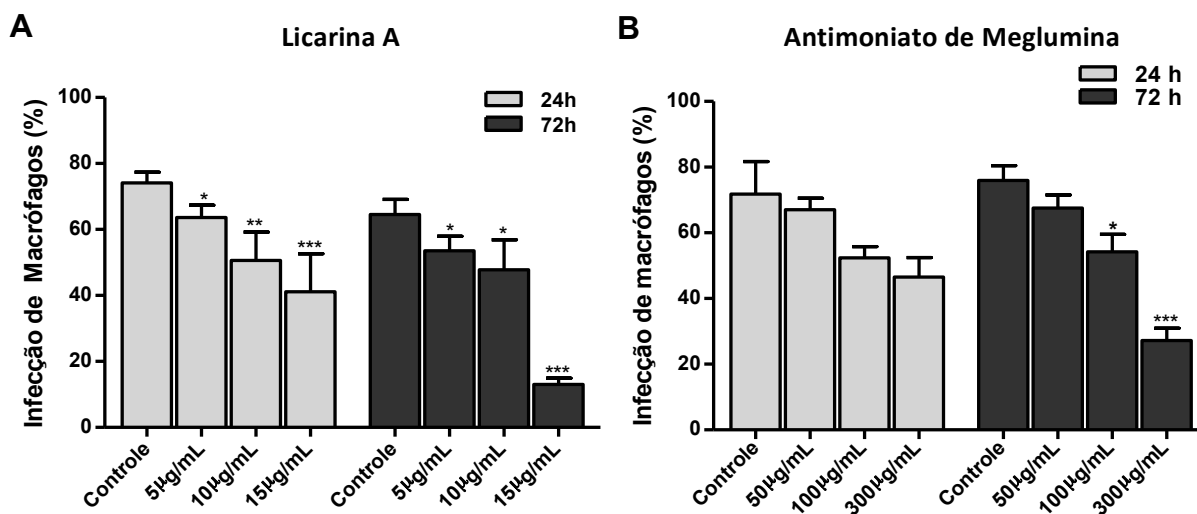
Aprofundando a investigação da atividade antileishmania da licarina A sobre a espécie *L. (L.) amazonensis*, foi estudada a atividade desta neolignana sobre formas amastigotas intracelulares. A análise da citotoxicidade da licarina A foi realizada pelo nosso grupo de pesquisa sobre macrófagos murinos, onde observamos um valor de CC_{50} de 308,96 $\mu\text{g/mL}$ utilizando a metodologia do corante vital azul de tripan (NÉRIS et al., 2013). Dessa forma, foram selecionadas para análise sobre as amastigotas intracelulares concentrações não citotóxicas para o macrófago hospedeiro (5, 10 e 15 $\mu\text{g/mL}$).

Os resultados referentes ao tratamento dos macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* com a licarina A, durante 24 e 72 horas, estão apresentados nos gráficos 3, 4 e 5. Para o tratamento de 24 horas com a licarina A, verificou-se que a partir da menor concentração analisada de 5 $\mu\text{g/mL}$ já foi possível observar uma redução de 14,08% na porcentagem de macrófagos infectados quando

comparados ao controle, sendo esta redução ainda mais proeminente para as maiores concentrações de 10 e 15 $\mu\text{g/mL}$ (31,68 e 44,5% respectivamente) (Gráfico 3A). Ao analisarmos a porcentagem de macrófagos infectados após 72 horas de tratamento com a neolignana, observou-se que sua atividade foi ainda maior, existindo uma redução na infecção de macrófagos de 17,03 e 27,12% para as concentrações de 5 e 10 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, e de 79,83% para a maior concentração analisada (15 $\mu\text{g/mL}$), em relação ao controle (Gráfico 3A).

O antimonioato de meglumina, utilizado como droga de referência, apresentou atividade apenas após 72 horas de exposição, onde verificou-se uma redução de 27,5 e 58,2% na porcentagem de macrófagos infectados após os tratamento com 100 e 300 $\mu\text{g/mL}$ da droga, respectivamente, quando comparados ao controle (Gráfico 3B).

Gráfico 3 – Efeito da licarina A e do antimonioato de meglumina sobre a porcentagem de macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*.

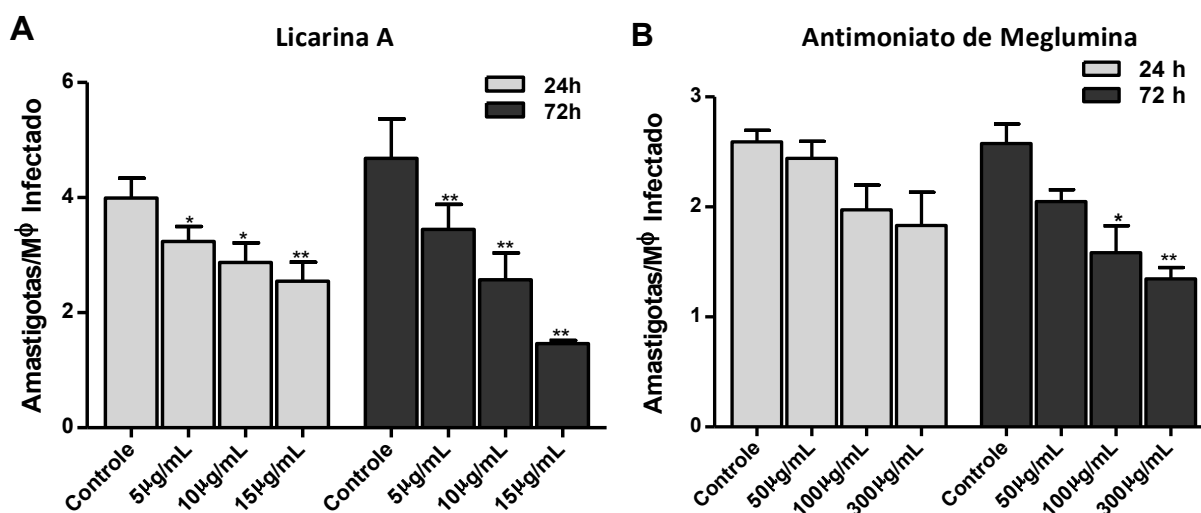


Fonte: Elaboração própria. Os MØ murinos foram infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (10 promastigotas:1MØ) e incubados na ausência [controle] ou presença de diferentes concentrações da licarina A (A) ou antimonioato de meglumina (B) durante 24 e 72 horas, em estufa de 5% de CO_2 a 37°C . O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em duplicata. Foi realizado o teste *t-student*, sendo $*p \leq 0,05$; $**p \leq 0,01$ e $***p \leq 0,001$ em comparação ao controle.

Ao avaliar o número de amastigota por macrófago infectado observa-se que, em todas as concentrações analisadas, a licarina A reduziu a quantidade de parasitas intracelulares quando comparadas ao controle, tanto para os tratamentos de 24 quanto 72 horas (Gráfico 4A). Após 24 horas de exposição à licarina A essa redução foi de 18,9; 28,06 e 36,23% para as concentrações de 5, 10 e 15 µg/mL, respectivamente (Gráfico 4A). O tratamento durante 72 horas aumentou expressivamente a atividade antileishmania dessa neolignana, de tal forma que as culturas tratadas com 5, 10 e 15 µg/mL da licarina A apresentaram uma redução de 26,31; 45,03 e 68,72% no número de amastigotas por macrófago infectado, respectivamente, quando comparados ao controle (Gráfico 4A).

De forma semelhante ao observado na infecção de macrófagos, o antimonioato de meglumina apresentou atividade apenas após 72 horas de tratamento, onde reduziu em 23 e 32,8% o número de amastigotas para as concentrações de 100 e 300 µg/mL, respectivamente (Gráfico 4B).

Gráfico 4 – Efeito da licarina A e do antimonioato de meglumina sobre o número de amastigota por macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*.

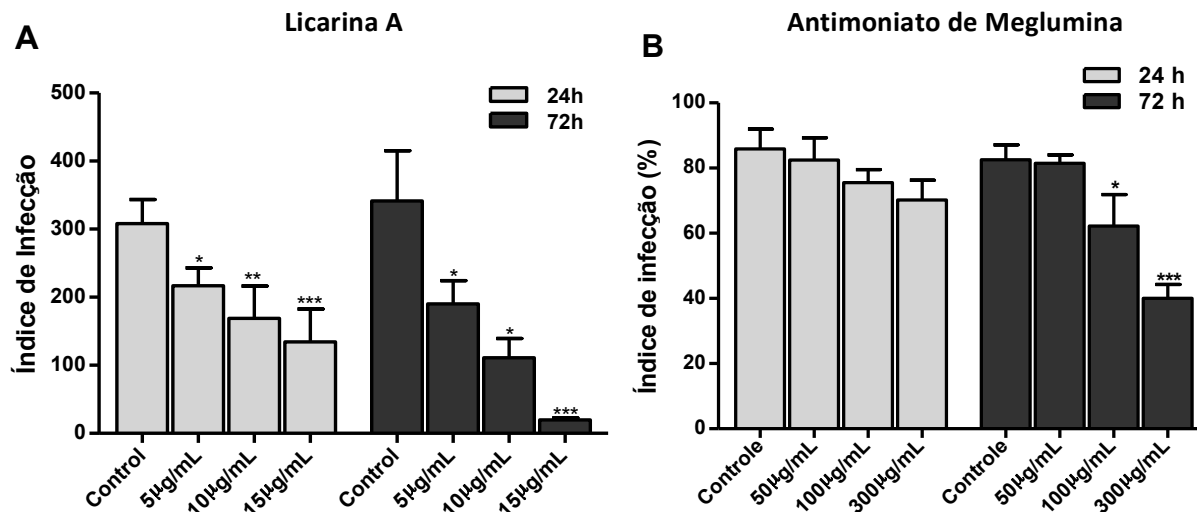


Fonte: Elaboração própria. Os MØ murinos foram infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (10 promastigotas:1MØ) e incubados na ausência [controle] ou presença de diferentes concentrações da licarina A (A) ou antimonioato de meglumina (B) durante 24 e 72 horas, em estufa de 5% de CO₂ a 37°C. O gráfico representa a média ± erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em duplicata. Foi realizado o teste *t-student*, sendo **p* ≤ 0,05 e ***p* ≤ 0,01 em comparação ao controle.

Os resultados do índice de infecção, que leva em consideração, ao mesmo tempo, a porcentagem de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófago infectado, estão expostos no gráfico 5. Verificou-se que em todas as concentrações analisadas houve redução no índice de infecção após 24 horas de exposição à licarina A, sendo a maior redução de 56,33% para a concentração de 15 µg/mL (Gráfico 5A). Esse resultado é ainda mais expressivo após 72 horas de tratamento com a neolignana, tanto para a concentração de 5 µg/mL (44,27%) quanto para as maiores concentrações: 10 µg/mL (67,41%) e 15 µg/mL (94,16%), em relação ao controle (Gráfico 5A).

Para o antimonio de meglumina observou-se redução no índice de infecção após 72 horas de exposição com as concentrações de 100 e 300 µg/mL, sendo esta redução de 22,1 e 50,9%, respectivamente (Gráfico 5B).

Gráfico 5 – Efeito da licarina A e do antimonio de meglumina sobre o índice de infecção de macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*.

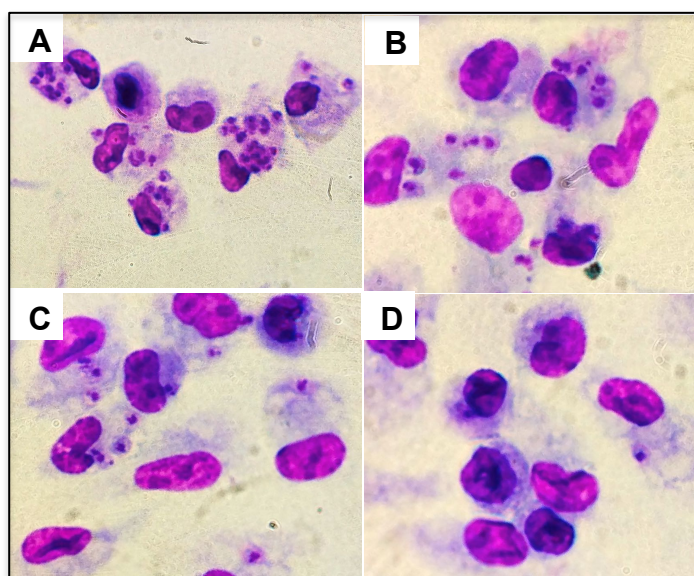


Fonte: Elaboração própria. Os MØ murinos foram infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (10 promastigotas:1MØ) e incubados na ausência [controle] ou presença de diferentes concentrações da licarina A (A) ou antimonio de Meglumina (B) durante 24 e 72 horas, em estufa de 5% de CO₂ a 37°C. O gráfico representa a média ± erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em duplicata. Foi realizado o teste *t-student*, sendo **p* ≤ 0,05; ***p* ≤ 0,01 e ****p* ≤ 0,001 em comparação ao controle.

Os dados obtidos da atividade antileishmania da licarina A nos ensaios de macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* expostos resultaram uma CE_{50} de 11,76 $\mu\text{g/mL}$ e 5,68 $\mu\text{g/mL}$ após 24h e 72h de tratamento com a neolignana, respectivamente. Para a droga de referência antimoniato de meglumina o tratamento durante 24 horas não possibilitou o cálculo da CE_{50} ($> 300 \mu\text{g/mL}$), contudo, para o tempo de 72 horas este fármaco apresentou uma CE_{50} de 169,43 $\mu\text{g/mL}$. Dessa forma, observou-se que a licarina A apresentou maior atividade antileishmania sobre macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* quando comparadas com a droga de referencia utilizada no Brasil para as leishmanioses em todos os tempos analisados, sendo a licarina A aproximadamente 30 vezes mais eficaz do que o antimoniato de meglumina no tempo de 72 horas.

As concentrações avaliadas da licarina A não foram citotóxicas para os macrófagos murinos, como já observado pelo nosso grupo de pesquisa (NÉRIS et al., 2013). A realização de uma análise qualitativa confirmou esse resultado, onde os macrófagos apresentaram-se com aspectos morfológicos semelhantes ao do controle, com células íntegras, não-vacuolizadas e não lisadas, demonstrando assim a atividade citotóxica da licarina A sobre as formas amastigotas intracelulares e não sobre sua célula hospedeira (Figura 11).

Figura 11 – Fotomicrografias de macrófagos murinos infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com a neolignana licarina A.



Fonte: Elaboração própria. Macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* na ausência – controle (A) e presença da Licarina A nas concentrações de 5 (B), 10 (C) e 15 $\mu\text{g/mL}$ (D) durante 72 horas. Coloração Panótico. AT: 1000x.

Visto que os macrófagos são as principais células hospedeiras dos parasitas do gênero *Leishmania* em mamíferos, os ensaios experimentais que utilizam amastigotas intracelulares representam um modelo eficaz em relacionar a atividade antileishmania de uma droga *in vitro* com o seu potencial *in vivo* (RUSSELL; TALAMAS-ROHANA, 1989; DE MUYLDER et al., 2011).

A atividade de outras neolignanas já foi observada em diversos estudos sobre amastigotas intracelulares de *Leishmania* sp.. Foi observado que as neolignanas medioresinol e (-)-lirioresinol B (concentração de 60 µg/mL) diminuíram em cerca de 60% a infecção de macrófagos com *L. (L.) amazonensis* (SAUVAIN et al., 1996). No ano de 2000, Barata e colaboradores verificaram atividade antileishmania sobre amastigotas intramacrofágicas de três neolignanas sintéticas, que apresentaram valores de CE₅₀ entre 24,32 e 50 µM, contudo, várias neolignanas avaliadas nesse trabalho foram ativas somente contra as formas promastigotas.

Dentre 19 lignanas dihidrobenzofuranas sintéticas avaliadas por Miert e colaboradores (2005) que apresentaram atividade sobre amastigotas axênicas, apenas quatro apresentaram atividade sobre amastigotas intracelulares, principalmente devido à lipofilicidade das moléculas. No ano de 2007, Aveniente e colaboradores ao analisarem 22 neolignanas sintéticas (concentração de 80 µg/mL), observaram que apenas seis apresentaram uma inibição maior que 50% na infecção causada por *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) donovani* sem causar citotoxicidade aos macrófagos. Em 2010, Vendrametto e colaboradores verificaram que a neolignana eupomatenóide-5 foi capaz de reduzir o índice de sobrevivência das amastigotas intramacrofágicas de *L. (L.) amazonensis* de forma bastante eficaz, apresentando CI₅₀ de 5 µg/mL. Isto demonstra a potencialidade dessa classe de moléculas também sobre as formas amastigotas de parasitas do gênero *Leishmania*.

Com relação à licarina A, já foi observado pelo nosso grupo de pesquisa sua atividade sobre macrófagos infectados com as espécies *L. (L.) major* e *L. (L.) chagasi* (NÉRIS, 2012; NÉRIS et al., 2013). Para a espécie *L. (L.) major*, esta neolignana foi capaz de reduzir expressivamente três parâmetros: a porcentagem de macrófagos infectados, o número de amastigotas por macrófago infectado e o

índice de infecção, quando as culturas foram expostas as concentrações de 5 e 20 µg/mL por 24 e 72 horas, existindo uma redução de praticamente 100% no índice de infecção após 72h de tratamento com a maior concentração (NÉRIS et al., 2013). Já para *L. (L.) chagasi*, observou-se atividade da licarina A após 24 horas de tratamento apenas com a concentração de 20 µg/mL. Para o tempo de 72 horas, ambas as concentrações (5 e 20µg/mL) foram capazes de reduzir os três parâmetros analisados, apresentando o valor máximo de 96,22% de redução no índice de infecção para a maior concentração analisada (NÉRIS, 2012).

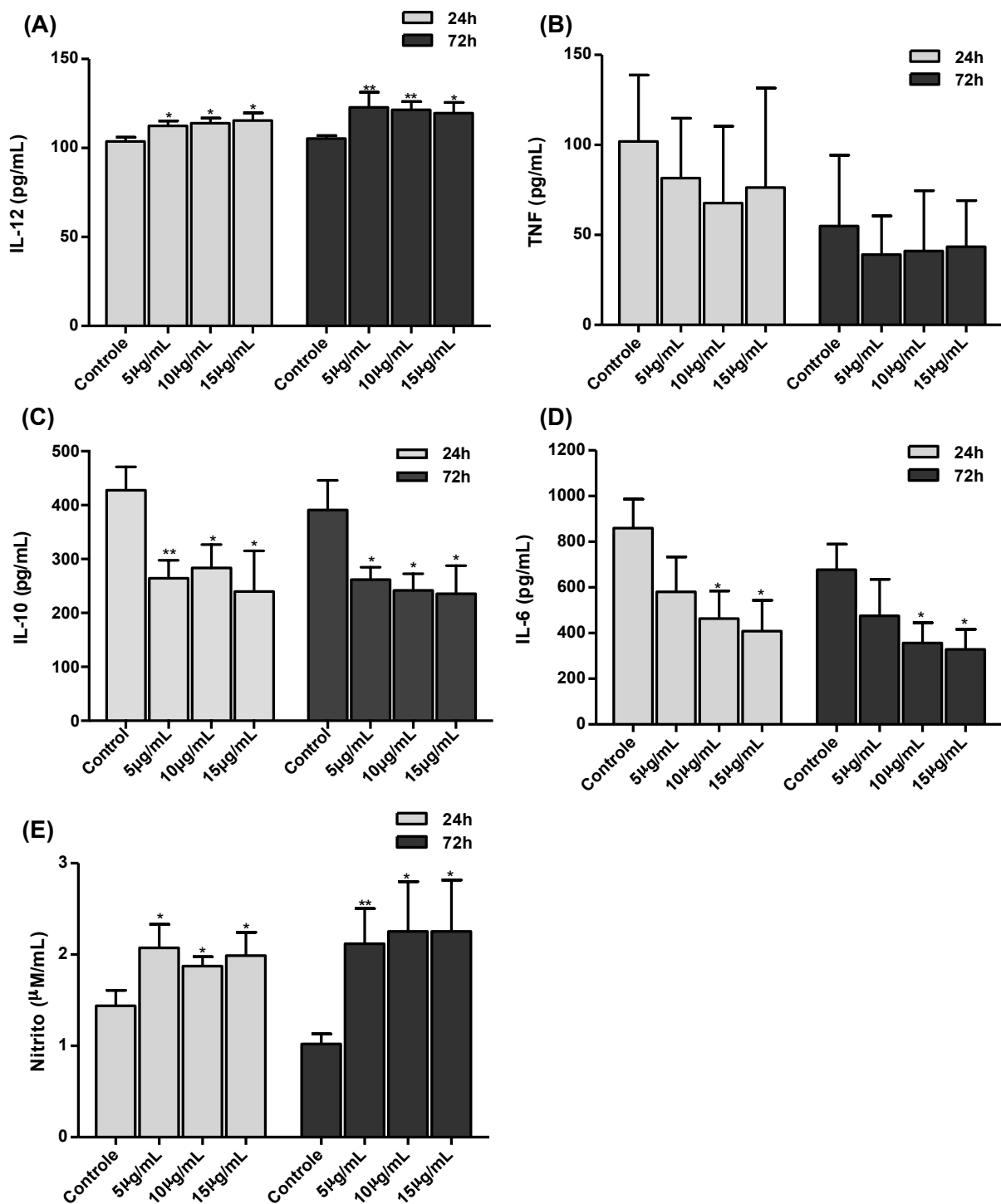
Visto a expressiva atividade anti-amastigota da licarina A sobre amastigotas intracelulares (CE₅₀/72h 5,68µg/mL), decidimos avaliar se esta neolignana também estaria exercendo atividade imunomoduladora sobre macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis*.

4.3.2. Atividade imunomoduladora da licarina A sobre macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* in vitro

A atividade antileishmania da licarina A sobre formas amastigotas intracelulares pode ser resultado tanto de uma ação direta da droga sobre o parasita, visto sua atividade sobre amastigotas axênicas, como também pode ser resultado de uma ação indireta pela ativação dos macrófagos, ou ainda, de combinação de ambas as ações. Para analisar uma possível atividade imunomoduladora foram realizadas as dosagens das citocinas TNF-α, IL-12, IL-6 e IL-10, além dos níveis de nitrito como indicativo da produção de óxido nítrico (NO) (Gráfico 6).

Observou-se um aumento nos níveis da citocina pró-inflamatória IL-12 para todos os tratamentos analisados, sendo este aumento de 8,44; 9,87 e 11,4% para as concentrações de 5, 10 e 15 µg/mL para o tempo de 24 horas, respectivamente. Após 72 horas de exposição à licarina A verificou-se um aumento de 16,65; 16,31 e 15,22% para as concentrações de 5, 10 e 15 µg/mL, respectivamente (Gráfico 6A). Não foi observado aumento na produção da citocina TNF-α, para os tratamentos realizados com a licarina A (Gráfico 6B).

Gráfico 6 - Níveis das citocinas TNF- α , IL-12, IL-6, IL-10 e nitrito produzidos por macrófagos murinos infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com licarina A.



Fonte: Elaboração própria. Os MØ murinos infectados foram incubados em estufa de CO₂ a 37°C na presença de diferentes concentrações da Licarina A durante 24 e 72 horas, e os níveis de IL-12 (A), TNF- α (B), IL-6 (C), IL-10 (D) e Nitrito (E) foram avaliados nos sobrenadantes das culturas pela técnica de ELISA (Kit Biociência®) e reagente de Griess. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes. Foi realizado o teste *t-student*, sendo * $p \leq 0,05$ e ** $p \leq 0,01$ em comparação ao controle.

A análise dos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 revelam que os tratamentos com todas as concentrações avaliadas induziram diminuição na sua produção, sendo essa redução de 38,56; 33,06 e 47,4% para as concentrações de 5, 10 e 15 µg/mL, respectivamente, após 24 horas de exposição. Níveis semelhantes desta redução foram observadas para o tratamento de 72 horas, sendo de 37,88; 40,9 e 42,74% para as concentrações de 5, 10 e 15 µg/mL, respectivamente (Gráfico 6C). Algo semelhante foi observado para a citocina IL-6, onde a exposição dos macrófagos infectados às maiores concentrações de licarina A (10 e 15 µg/mL) induziram diminuição na sua síntese, sendo esta redução de 46,1% (10 µg/mL) e 52,46% (15 µg/mL) após 24 horas de tratamento, e de 47,39% (10 µg/mL) e 51,5% (15 µg/mL) após 72 horas de exposição à neolignana (Gráfico 6D).

O óxido nítrico é uma das principais moléculas leishmanicidas produzidas por macrófagos ativados (MASPI et al., 2016). A investigação dos seus níveis nos sobrenadantes das culturas de macrófagos infectados expostos a licarina A revelam que essa neolignana induziu um aumento expressivo na produção dessa molécula nos tratamentos realizados, para ambos os tempos de 24 e 72 horas (Gráfico 6E). Verificou-se que após 24 horas de exposição à licarina A houve um aumento de 44,75; 30,77 e 38,46% nos níveis de nitrito para as concentrações de 5, 10 e 15µg/mL, respectivamente (Gráfico 6E). Para o tempo de 72 horas, este aumento foi ainda maior, sendo de 106,86% (5 µg/mL), 120,58% (10 µg/mL) e 120,34% (15 µg/mL) (Gráfico 6E).

A estimulação do sistema imunológico, especialmente para a produção de citocinas pró-inflamatórias do perfil Th1, como IL-12 e TNF-α, que induzem a eliminação dos parasitas do gênero *Leishmania*, assim como diminuição dos níveis de citocinas do perfil de susceptibilidade para as leishmanioses (Th2), como IL-10, IL-4 e IL-6, vêm sendo objeto de desejo para fármacos que apresentam atividade leishmanicida (GUPTA et al., 2014; MASPI et al., 2016).

A citocina IL-12 age como uma citocina essencial para a diferenciação de um perfil protetor Th1 nas leishmanioses, sendo produzida por diferentes células como macrófagos e células dendríticas (MASPI et al., 2016). Esta citocina está envolvida na ativação das células parasitadas devido a produção de TNF- α, IFN-

γ e NO, o que leva a eliminação das formas amastigotas intracelulares (SACKS; NOBEN-TRAUTH; 2006; TRIPATHI, 2007; MASPI et al., 2016). Diversos modelos experimentais utilizando camundongos infectados com *L. (L.) major* já demonstraram o papel protetor desta citocina na infecção por *Leishmania*, inclusive a imunoterapia com esta citocina induziu uma redução na lesão e carga parasitária de animais BALB/c infectados com *L. (L.) major* (SYPEK et al., 1993; HEINZEL et al., 1993; MASPI et al., 2016).

O TNF- α é uma citocina pró-inflamatória produzida por vários tipos de células, incluindo macrófagos (BAUD; KARIN, 2001; MASPI et al., 2016). Esta citocina, ao se ligar ao seu receptor, induz a ativação de diversas vias de sinalização intracelulares, dentre elas, a ativação do fator de transcrição nuclear κ B (NF- κ B) que modula a transcrição de vários genes relacionados à resposta imune, dentre os quais o gene da iNOS (LIEW et al., 1990; BOGDAN et al., 2000; BAUD; KARIN, 2001; VILA-DEL SOL et al., 2007; MUNIZ-JUNQUEIRA; PAULA-COELHO, 2008). Após a indução, a iNOS produz continuamente NO até a enzima ser degradada, sendo esta molécula um importante agente leishmanicida (LIEW et al., 1997; MURRAY; NATHAN, 1999; MASPI et al., 2016).

A IL-6 é uma citocina que apresenta propriedades tanto pró-inflamatórias quanto anti-inflamatórias (HEINRICH et al., 2003; SCHELLER et al., 2011), sendo produzida por diferentes células como macrófagos e linfócitos T (SCHELLER et al., 2011). Em modelo de leishmaniose cutânea experimental, já foi observado que a IL-6 induz susceptibilidade à leishmaniose (MOSKOWITZ et al., 1997), visto que promove uma diferenciação Th2 pela produção de IL-4, além de bloquear diretamente a via de sinalização de INF- γ , impedindo a formação efetiva de uma resposta Th1 (DIEHL; RINCÓN, 2002; SCHELLER et al., 2011). Em adição, observou-se que o tratamento de macrófagos com IL-6 suprime a atividade leishmanicida induzida por IFN- γ e TNF- α , indicando uma atividade inibitória da IL-6 para uma resposta Th1 (HATZIGEORGIOU et al., 1993).

A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória relacionada à resposta imune Th2, associada à susceptibilidade na infecção por *Leishmania*. Esta citocina atua principalmente inibindo a ativação de macrófagos, e consequentemente, sua atividade leishmanicida, permitindo assim a sobrevivência dos parasitas

(ROGERS et al., 2002; AWASTHI et al., 2004; SACKS; NOBEN-TRAUTH; 2006; TRIPATHI, 2007). Em infecções experimentais com camundongos que neutralizam a atuação desta citocina foi observado controle da infecção e/ou cura (BELKAID et al., 2001; ANDERSON et al., 2005), além de seus altos níveis estarem correlacionado, em muitos casos, com a progressão e severidade da doença em pacientes infectados (ANSARI et al., 2006; PERUHYPE-MAGALHÃES et al., 2006; SALHI et al., 2008). Contudo, a presença dessa citocina também é importante visto que ela inibe danos teciduais causados por uma produção exacerbada das citocinas inflamatórias (CASTELLANO et al., 2015).

Correlacionado a atividade anti-mastigota apresentadas pela licarina A no presente trabalho com a síntese das citocinas estudadas, verificou-se que apesar dos níveis de TNF- α não terem sido alterados após exposição à licarina A, os níveis aumentados de IL-12 pela neolignana podem estar induzindo a ativação dos macrófagos, com consequente produção da molécula leishmanicida NO e eliminação dos parasitas. Adicionalmente, a diminuição nos níveis das citocinas IL-6 e IL-10 pode contribuir para ação efetora do macrófago infectado, associado à síntese de NO (mais de 100% em relação ao controle para o tempo de 72 horas).

A atividade imunomoduladora da licarina A já foi observada pelo nosso grupo de pesquisa sobre macrófagos infectados com *L. (L.) major*, visto que o tratamento com 20 μ g/mL da licarina A induziu diminuição nos níveis das citocinas IL-6 e IL-10 (NÉRIS et al., 2013). Esse efeito imunomodulador foi também observado no presente trabalho onde utilizou-se a espécie *L. (L.) amazonensis* e concentrações bem menores da neolignana.

4.4. Obtenção e análise de *Leishmania (L.) amazonensis* resistentes ao antimonial trivalente

O surgimento de formas resistentes de parasitas do gênero *Leishmania* à principal droga utilizada no tratamento das leishmanioses, o antimonial pentavalente (Sb^V), vem sendo uma crescente problemática nos últimos anos,

resultando em falhas na resposta ao tratamento das leishmanioses. O tratamento irregular e incompleto com este medicamento contribuiu com o desenvolvimento de cepas resistentes ao Sb^V na Índia, onde cerca de 65% dos pacientes com leishmaniose não apresentam mais resposta ao tratamento com o Sb^V ou apresentam relapso da doença após tratamento (SUNDAR et al., 2001; MOHAPATRA, 2014). Recentes estudos têm sugerido a existência de uma correlação entre a resistência dos parasitos a antimoniais e parâmetros de virulência, agravando ainda mais a problemática na terapêutica das leishmanioses (OUAKAD et al., 2011; VANAERSCHOT et al., 2010; VANAERSCHOT et al., 2011). Portanto, na busca por drogas alternativas para tratamento das leishmanioses, é pertinente conhecer se estas novas drogas são também efetivas contra parasitos resistentes aos antimoniais.

Com o intuito de conhecer a eficácia da neolignana licarina A sobre cepas de *L. (L.) amazonensis* resistentes aos antimoniais, foram selecionadas culturas de *L. (L.) amazonensis* resistentes ao antimônio trivalente pelo nosso grupo de pesquisa, por múltiplas passagens desses parasitos em concentrações sub-ótimas da droga de forma crescente (FRADE, 2016). Esses parasitos resistentes ao Sb^{III} foram inicialmente avaliados quanto ao perfil de crescimento, atividade de transportadores ABC e grau de metilação total de DNA, assim como infectividade *in vitro* e *in vivo*. Posteriormente foi investigada a sensibilidade dos parasitos à neolignana licarina A.

4.4.1. Obtenção de *L. (L.) amazonensis* resistentes ao antimonial trivalente

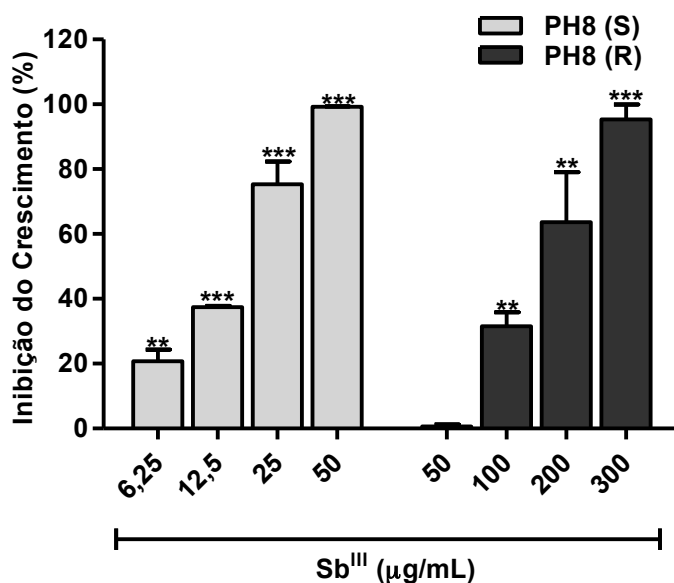
Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foram cultivadas concomitantemente na presença e na ausência de concentrações crescentes do Sb^{III} durante a indução de resistência a essa droga para obtenção de cepas resistentes. Após 55 repiques foram obtidas duas culturas de *L. (L.) amazonensis* capazes de crescer em uma concentração do Sb^{III} de 135,3 $\mu\text{g/mL}$ (15x a CI_{50} inicial do Sb^{III}). Contudo, quando essas duas linhagens resistentes foram cultivadas na ausência do antimônio trivalente, uma apresentou estabilidade em

sua resistência ao Sb^{III} enquanto a outra apresentou um padrão reversível na resistência após dezoito repiques sem a presença da droga (FRADE, 2016).

No presente trabalho, para dar continuidade aos estudos, foi escolhida cultura de *L. (L.) amazonensis* com perfil estável de resistência, sendo denominada PH8(R), e o seu controle selvagem que apresenta o mesmo número de passagens *in vitro*, denominado PH8(S). A obtenção dos pares PH8(S) e PH8(R) com o mesmo número de repiques foi um importante controle experimental, pois ambas passaram pela mesma pressão para atenuação da virulência como já descrito na literatura (SEGOVIA et al., 1992; MOREIRA et al., 2012). Além disto, ambas as culturas celulares têm o mesmo *background genético*, pois foram oriundas de uma mesma cepa.

Inicialmente, avaliou-se o nível de resistência que estas culturas celulares possuíam. Verificando o crescimento das culturas PH8(S) e PH8(R) na presença do Sb^{III}, observa-se que a cultura PH8 (S) apresenta inibição de crescimento a partir da concentração de 6,25 µg/mL ($20,70 \pm 3,64\%$), sendo essa inibição de $37,48 \pm 0,38$; $75,33 \pm 3,05$ e $99,21 \pm 0,12\%$ para as concentrações analisadas de 12,5; 25 e 50 µg/mL, respectivamente (Gráfico 7). Já a cultura PH8 (R) só apresentou uma inibição de crescimento a partir da concentração de 100 µg/mL, sendo esta de $31,53 \pm 4,33\%$ (Gráfico 7). Para as maiores concentrações os valores de inibição foram de $63,61 \pm 15,4\%$ (200 µg/mL) e $95,39 \pm 4,55\%$ (300 µg/mL) quando comparadas ao controle (Gráfico 7). Esses dados resultaram em valores de CI_{50} de 12,21 e 228,99 µg/mL respectivamente, para PH8(S) e PH8(R). Dessa forma, verifica-se que a cultura PH8(R) apresenta um índice de resistência de 18,7 vezes maior quando comparadas a cultura sensível.

Gráfico 7 – Inibição de crescimento de formas promastigotas sensível e resistente frente a diferentes concentrações do antimonial trivalente.



Fonte: Elaboração própria. As formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (1×10^6 células/mL) sensível [PH8 (S)] e resistente [PH8 (R)] foram cultivadas em meio Schneider completo à 26°C na presença do antimonial trivalente (Sb^{III}). Após 72h, as culturas foram quantificadas em câmara de Neubauer. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. Foi realizado o teste *t-student*, sendo $**p \leq 0,01$ e $***p \leq 0,001$ em comparação ao controle.

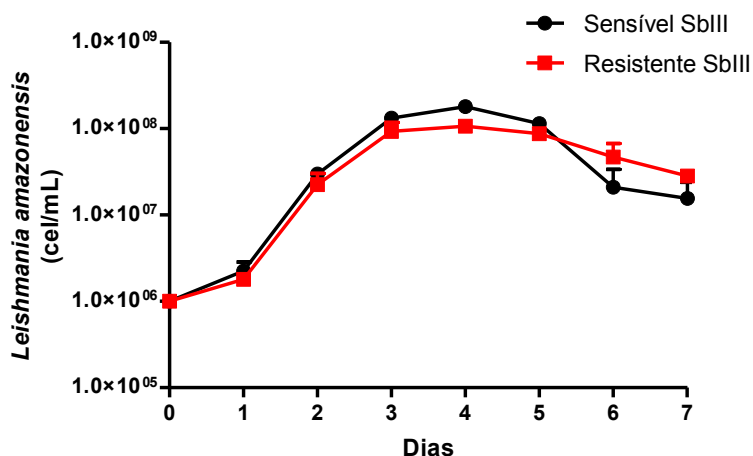
O índice de resistência obtido para *L. (L.) amazonensis* foi bastante satisfatório. Analisando quatro espécies do novo mundo, Liarte e Murta (2010) conseguiram um índice de resistência menor para a espécie *L. (L.) amazonensis* mutante, sendo este índice de 6, além de apresentar reversão parcial no seu perfil de resistência. Para as espécies *L. (L.) chagasi*, *L. (V.) braziliensis* e *L. (V.) guyanensis* os índices de resistência foram de 4, 20 e 19, respectivamente, onde a espécie *L. (V.) braziliensis* também apresentou reversão em sua resistência (LIARTE; MURTA, 2010). Monte-Neto e colaboradores (2011) obtiveram sucesso em selecionar quatro mutantes de *L. (L.) amazonensis* com índices de resistência maiores que 30, contudo, apenas um mutante apresentou-se estável após vinte passagens sem a droga, onde os demais mostraram decréscimo no nível de resistência.

4.4.2. Perfil de crescimento de *L. (L.) amazonensis* resistentes ao antimonial trivalente em meio de cultivo.

Após obtenção das culturas de *L. (L.) amazonensis* sensível [PH8(S)] e resistente [PH8(R)] ao Sb^{III} , analisou-se os seus perfis de crescimento para determinar o tempo necessário de cultivo para os parasitos atingirem as fases logarítmica (log) e estacionária de crescimento, visto que a realização das futuras análises biológicas dependiam deste conhecimento.

Ambas as culturas PH8(S) e PH8(R) apresentaram um perfil de crescimento semelhantes, com fase log até o terceiro dia de cultivo, onde começaram a apresentar uma atenuação no crescimento característica do início da fase estacionária (Gráfico 8). Contudo, pequenas diferenças foram observadas após as culturas atingirem a fase estacionária de crescimento. Enquanto que na linhagem sensível observou-se uma queda acentuada no número de células entre o quinto e o sexto dia, na cultura resistente essa queda foi mais tênue (Gráfico 8). Dessa forma, para os posteriores ensaios que necessitavam de formas promastigotas em fase log, tanto a cultura sensível quanto a resistente foram cultivadas por três dias de crescimento. No entanto, para as análises que necessitaram de culturas em fase estacionária de crescimento, os parasitos foram cultivados por cinco ou seis dias.

Observou-se durante a padronização experimental que a cultura PH8 (R) apresentou melhores resultados durante o sexto dia de crescimento, enquanto as culturas sensíveis no seu quinto dia de crescimento. Isto se deve provavelmente às diferenças observadas entre os perfis de crescimento entre as culturas após atingirem a fase estacionária.

Gráfico 8 – Perfil de crescimento de formas sensível e resistente ao antimonial trivalente.

Fonte: Elaboração própria. Formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (1×10^6 células/mL) sensível [PH8 (S)] e resistente [PH8 (R)] foram cultivadas em meio Schneider completo, incubadas à temperatura de 25°C e quantificadas diariamente em câmara de Neubauer. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em duplicata.

Estudos prévios mostraram que o perfil de crescimento observado para linhagens de *L. (L.) donovani* derivadas de isolados clínicos sensíveis e resistentes ao Sb^V apresentaram sutis diferenças, onde as linhagens Sb^V -sensíveis cresceram de forma mais rápida do que os clones Sb^V -resistentes (OUAKAD et al., 2011). Isto levou os pesquisadores a adotarem dias diferentes de cultivo dos clones Sb^V -sensíveis e Sb^V -resistentes para os ensaios em fase estacionária (dia 6 e 8, respectivamente), embora coincidisse para os experimentos em fase log (3º dia de crescimento) (OUAKAD et al., 2011).

Diferenças nos perfis de crescimento também foram relatados para culturas de *L. (L.) infantum* sensível e resistente à miltefosina, onde o resistente apresentou uma taxa de crescimento menor (HENDRICKX et al., 2016). Contudo, nesse mesmo trabalho, cepas de *L. (L.) infantum* sensível e resistente à paramomicina não apresentaram diferenças no perfil de crescimento (HENDRICKX et al., 2016), onde o mesmo ocorreu para culturas de *L. (L.) major* sensível e resistente à miltefosina (TUERNER et al., 2015), demonstrando assim que a aquisição de resistência Sb^{III} pode influenciar ou não na capacidade proliferativa do parasita.

4.4.3. Perfil da infecção de *L. (L.) amazonensis* resistente ao antimonial trivalente *in vitro* e *in vivo*

Diversos estudos vêm demonstrando nos últimos anos uma correlação entre a obtenção de resistência à droga pelo parasita do gênero *Leishmania* e o seu “fitness” (VANAERSCHOT et al., 2011; OUAKAD et al., 2011; HENDRICKX et al., 2016). O “fitness” de um patógeno é um complexo conjunto de fatores que garantem sua sobrevivência, reprodução, infectividade e transmissão (VANAERSCHOT et al., 2013; GARCIA-HERNANDEZ et al., 2015).

Nosso grupo de pesquisa observou que o mutante PH8 (R) obtido em nosso laboratório apresentou uma maior resistência à lise pelo sistema complemento quando comparada com seu par sensível (FRADE, 2016), sendo esse teste considerado um marcador para avaliação da metaciclogênese de uma cultura (OUAKAD et al., 2011). No presente trabalho foram realizados outros estudos biológicos com o intuito de ampliar a investigação sobre uma possível correlação entre os parâmetros resistência aos antimoniais e virulência *in vitro* e *in vivo*.

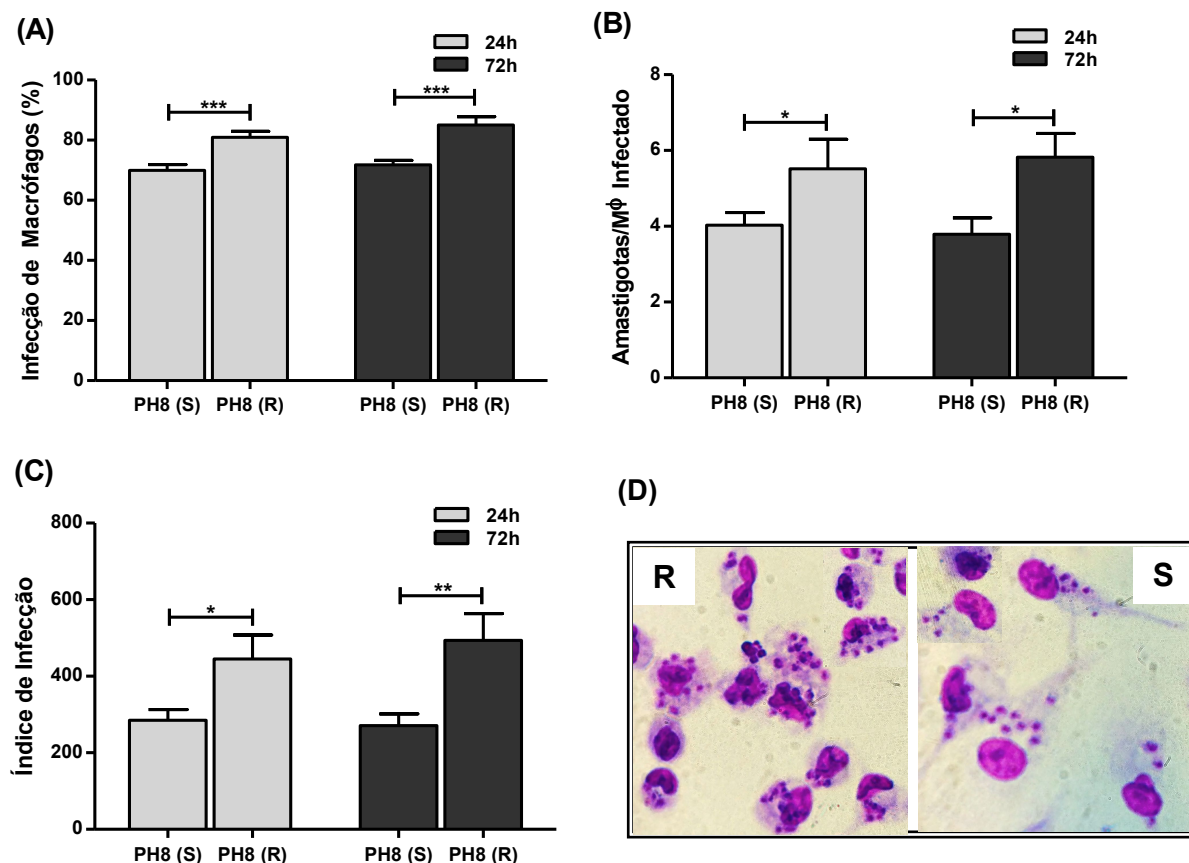
4.4.3.1. Infecção *in vitro* de macrófagos murinos com *L. (L.) amazonensis* sensível ou resistente ao antimonial trivalente.

As análises de virulência *in vitro* mostraram diferenças significativas entre as culturas sensível e resistente em modelo de infecção de macrófagos murinos (Gráfico 9). Observou-se que a cultura PH8(R) apresentou uma maior taxa de infecção de macrófagos quando comparada a cultura sensível, sendo estas de $80,92 \pm 1,91\%$ e $69,93 \pm 2,05\%$ para PH8(R) e PH8 (S), respectivamente, após 24 horas da infecção (Gráfico 9A). Para o tempo de 72 horas de infecção, a porcentagem de macrófagos infectados continuou sendo maior para a cultura resistente ($85,06 \pm 1,46\%$) quando comparadas com a sensível ($71,80 \pm 1,46\%$) (Gráfico 9A).

A análise do número de amastigotas por macrófago infectado também demonstrou uma maior virulência da cultura resistente, visto que a média de

amastigotas por macrófago foi de $4,03 \pm 0,33$ para PH8(S) e $5,51 \pm 0,78$ para PH8(R), para o tempo de 24 horas, e de $3,79 \pm 0,43$ para PH8 (S) e $5,82 \pm 0,62$ para PH8(R), no tempo de 72 horas (Gráfico 9B).

Gráfico 9 – Análise da infectividade *in vitro* de culturas sensível e resistente ao Sb^{III}.



Fonte: Elaboração própria. Os MØ murinos foram infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* sensível [PH8(S)] e resistente [PH8(R)] ao Sb^{III} (10 promastigotas:1MØ) durante 3 horas e incubados durante 24 e 72 horas em estufa de 5% de CO₂ a 37°C. (A) Infecção de macrófagos. (B) Número de amastigotas por macrófago infectado. (C) Índice de infecção e (D) Fotomicrografias de macrófagos murinos infectados com culturas sensíveis (S) e resistentes (R) ao Sb^{III} (aumento total de 1000x). Os gráficos representam a média $\pm$ erro padrão da média de quatro experimentos independentes realizados em duplicata. Foi realizado o teste t-student, sendo * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$.

Quando foi analisado o índice de infecção pode-se observar que, novamente, a cultura resistente apresenta um valor mais elevado, apresentando um índice de infecção 1,56 vezes maior para o tempo de 24 horas, e 1,82 vezes maior para 72 horas quando comparado a cultura sensível (Gráfico 9C). O gráfico

9D demonstra uma representação qualitativa das culturas de macrófagos infectados com PH8(S) e (R) ao Sb^{III} após 24 e 72 horas de infecção, onde observa-se a integridade dos macrófagos infectados.

Os resultados expostos demonstram que a linhagem de *L. (L.) amazonensis* resistente ao antimonial trivalente apresentou maior virulência *in vitro* quando comparada a linhagem sensível, visto que a PH8(R) apresentou maior eficácia em infectar e manter essa infecção por até 72 horas.

Vários estudos vêm demonstrando uma maior virulência *in vitro* de cepas de *Leishmania* resistentes a drogas quando comparados com as linhagens sensíveis (CARTER et al., 2005; VANAERSCHOT et al., 2010; OUKAD et al., 2011). Essa maior virulência está associada a uma maior capacidade de metaciclogênese das culturas resistentes de *L. (L.) donovani* (OUKAD et al., 2011), e também à habilidade que as cepas resistentes possuem de inibir uma resposta imune efetiva pelas células parasitadas (HALDAR et al., 2010; MUKHOPADHYAY et al., 2011).

Sabe-se que, no hospedeiro vertebrado, promastigotas metacíclicas de *Leishmania* se diferenciam em amastigotas predominantemente no interior de macrófagos, onde eles são expostos a vários estresses como pH ácido, altas temperaturas e produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio (GARCÍA-HERNANDEZ et al., 2015). Frente a isso, García-Hernandez e colaboradores (2015) também observaram um maior índice de infecção em macrófagos infectados com linhagens resistentes de *L. (L.) donovani*, visto que estas apresentaram maior tolerância a diversas condições de estresse, como altas temperaturas e variação de pH, o que estaria facilitando a sobrevivência dos patógenos no interior dos macrófagos. Em 2005, Holzmüller e colaboradores também observaram que amastigotas de *L. (L.) infantum* resistente ao Sb^{III} foram mais resistentes à ação do NO, tanto em sua forma axênica (extracelular) quanto em sua forma intracelular em macrófagos ativados. Essa resistência cruzada com NO também foi observada por Moura e colaboradores (2016) em isolados clínicos de *L. (L.) infantum* de pacientes reincidentes ao tratamento com Sb^V, na qual os isolados resistentes apresentaram maiores índices de infecção em macrófagos ativados quando comparados com as cepas obtidas de pacientes responsivos.

Dessa forma, torna-se interessante analisar futuramente se essa maior virulência *in vitro* observada no presente trabalho esta correlacionada com uma maior capacidade da linhagem PH8 (R) em resistir à ação microbicida dos macrófagos parasitados.

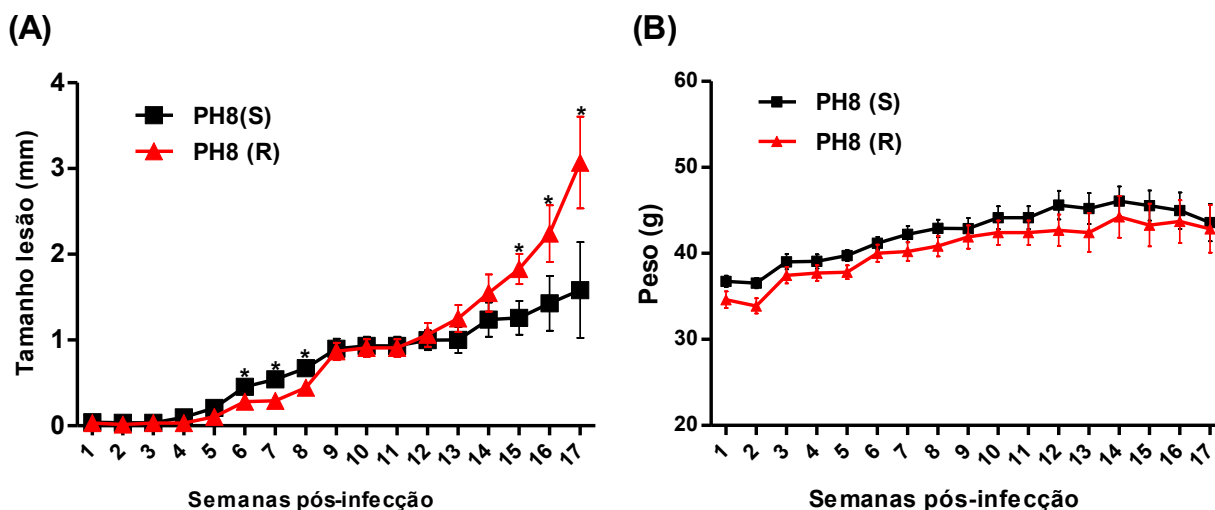
4.4.3.2. Infecção *in vivo* de camundongos Swiss com *L. (L.) amazonensis* sensível ou resistente ao antimonial trivalente.

Aprofundando às análises de virulência em culturas de *L. (L.) amazonensis* resistente ao Sb^{III}, camundongos Swiss foram infectados no coxim plantar da pata posterior direita e analisados durante um período de 17 semanas. Os resultados estão plotados no gráfico 10. Observa-se que o a lesão demorou cerca de 5 semanas para começar a aparecer nos animais infectados (Gráfico 10A). Estudos anteriores de infecção *in vivo* com *L. (L.) amazonensis* recém isolada mostraram que após duas semanas de infecção já é possível visualizar lesões (NÉRIS, 2012; RODRIGUES, 2017). As culturas utilizadas para a infecção *in vivo* no presente estudo apresentavam um elevado número de repiques (77º repiques), e visto que o maior número de passagens *in vitro* leva a uma atenuação na virulência das formas promastigotas de *Leishmania* (SILVA; SACKS, 1987; SEGOVIA et al., 1992; MOREIRA et al., 2012), os resultados obtidos estão de acordo com a literatura.

Durante a sexta e oitava semana, verifica-se que os animais infectados com PH8 (S) apresentaram lesões maiores que os animais infectados com PH8(R) (Gráfico 10A). Contudo, as lesões entre os grupos voltaram a serem similares a partir da nona semana até a décima quarta semana (Gráfico 10A). A partir da decima quinta semana, os animais infectados com *L. (L.) amazonensis* resistente ao Sb^{III} apresentaram lesões significativamente maiores que aqueles infectados com a cepa sensível, e essas lesões tornaram-se progressivamente maiores até a décima sétima semana de infecção, que foi a última observada (Gráfico 10A). Por questões éticas, os animais foram eutanasiados na décima sétima semana com o objetivo de evitar maiores sofrimentos causados pelas

lesões. Não foi observada diferença entre o peso dos animais de ambos os grupos durante todo o período experimental (Gráfico 10B).

Gráfico 10 – Tamanho de lesão e peso de camundongos Swiss infectados experimentalmente com culturas sensível e resistente ao Sb^{III}.

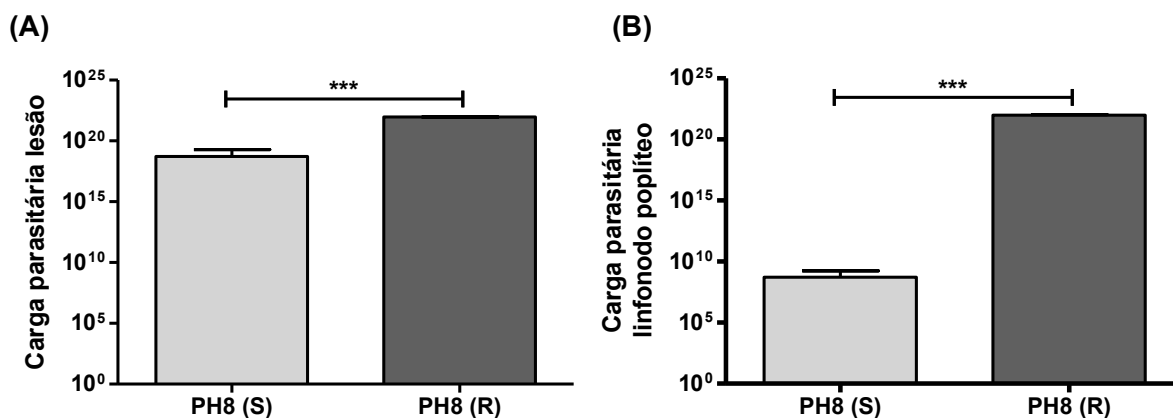


Fonte: Elaboração própria. Camundongos Swiss foram infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* sensíveis [PH8(S)] e resistentes [PH8(R)] ao Sb^{III} no coxim plantar da pata posterior direita e analisados semanalmente durante 17 semanas quanto ao tamanho de lesão (A) e peso corporal (B). O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média de cada grupo. Foi realizado o teste *t-student*, sendo $*p \leq 0,05$.

Após dezessete semanas da infecção dos camundongos Swiss com culturas de *L. (L.) amazonensis* sensível e resistente ao Sb^{III}, os animais foram eutanasiados e a carga parasitária da pata e linfonodo poplíteo direito foram analisadas por diluição sucessiva (OLIVEIRA et al., 2005; NÉRIS, 2012).

Verificou-se que houve uma maior carga parasitária nos animais infectados com PH8(R) quando comparados ao grupo infectado com a cepa sensível (Gráfico 11A). Essa diferença na carga parasitária foi ainda maior quando avaliou-se o linfonodo poplíteo dos animais, onde o grupo infectado com PH8(R) apresentou uma carga parasitária muito superior (título de diluição de 10^{10}) do que o grupo infectado com PH8(S) (título de diluição de 10^{21}) (Gráfico 11B).

Gráfico 11 – Carga parasitária da lesão e do linfonodo poplíteo dos camundongos Swiss infectados com culturas de *L. (L.) amazonensis* sensível e resistente ao antimonial trivalente.



Fonte: Elaboração própria. Após 17 semanas de infecção, camundongos Swiss infectados com *L. (L.) amazonensis* sensível [PH8(S)] e resistente [PH8(R)] ao antimonial trivalente (Sb^{III}). Os animais foram eutanasiados e a carga parasitaria da lesão na pata (A) e do linfonodo poplíteo direito (B) foram analisadas através de diluição sucessiva. Dados são representativos da média de nove animais por grupo. Foi realizado o teste *t-student*, sendo $***p \leq 0,001$.

Camundongos BALB/c infectados com cepas de *L. (L.) donovani* naturalmente sensíveis e resistentes ao Sb^V demonstraram que os animais infectados com a cepa resistente apresentaram uma maior carga parasitaria no fígado e baço (VANAERSCHOT et al., 2010; VANAERSCHOT et al., 2011), mesmo após 4 meses de infecção (CARTER et al., 2005). O mesmo não foi observado para cepas de *L. (L.) donovani* resistentes à paramomicina, onde apesar de ser observada uma maior quantidade de células metacíclicas nas culturas resistentes não foi observada uma grande diferença na sua virulência *in vitro* e *in vivo* (HENDRICKX et al., 2015).

Já para o modelo experimental de leishmaniose tegumentar utilizando camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) major* resistentes à miltefosine produzidos em laboratório, observou-se que a cultura resistente apresentou uma virulência atenuada, com animais apresentando lesões menores e que demoraram mais tempo para aparecer quando comparadas ao controle sensível (TURNER et al., 2015), diferente do que estamos observando em nosso modelo experimental utilizando cepas de *L. (L.) amazonensis* resistentes ao Sb^{III} .

4.4.4. Avaliação da atividade de transportadores ABC em *L. (L.) amazonensis* resistentes ao antimônio trivalente

Estudos com cepas de *Leishmania* sp. resistentes ao antimônio indicaram que diversos mecanismos podem estar ocorrendo no parasita para resultar em um menor acúmulo da droga em seu interior, conferindo assim sua resistência (FRÉZARD et al., 2014). Dentre esses mecanismos temos o efluxo ou o sequestro da droga para vesículas intracelulares por transportadores ABC (*ATP-binding cassette*) (FRÉZARD et al., 2014). Duas subclasses de transportadores ABC parecem estar envolvidas na resistência em *Leishmania*, dentre elas carreadores homólogos à P-glicoproteína (PgP), também denominada MDR1 (*multidrug resistance protein 1*), e a Proteínas Associadas a Resistência à Múltipla Drogas (MRP) semelhantes aos de mamíferos (FRÉZARD et al., 2014).

Para analisar a atividade dos transportadores ABC em cepas de *L. (L.) amazonensis* resistentes ao Sb^{III}, foi utilizado o substrato Rhodamine 123 e os bloqueadores Rev 205 (reversina 205) e MK571, inibidores específicos da PgP (SHAROM et al., 1999) e MRP (GEKELER et al., 1995), respectivamente (RAI et al., 2013).

O gráfico 12 apresenta os resultados da atividade das bombas de efluxo em formas promastigotas sensíveis e resistentes ao Sb^{III}. Não foi possível observar atividade dos transportadores ABC com a utilização do substrato Rho-123, visto que não houve aumento no acúmulo intracelular do substrato na presença dos bloqueadores específicos para os transportadores PgP (Rev 205) e MPR (MK571) tanto na cepa sensível quanto na cepa resistente (Gráfico 12). Além disto, não foi observada diferença na intensidade de fluorescência da Rho-123 entre as linhagens PH8 (S) e PH8 (R) (Gráfico 12).

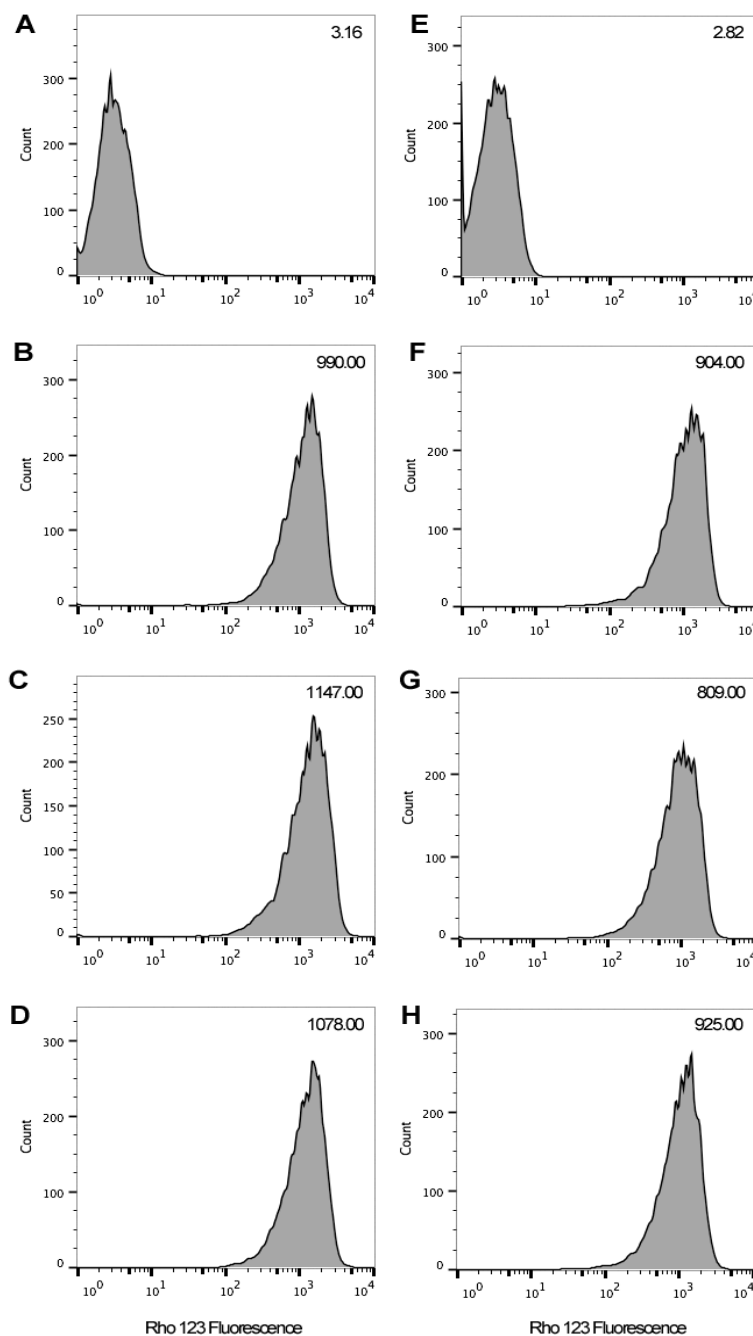
Para a cultura de *L. (L.) amazonensis* sensível ao Sb^{III} verificou-se o valores de MIF de $902,33 \pm 76,64$; $1247,33 \pm 179$ e $1097,33 \pm 16,74$ para as células marcadas apenas com Rho 123, com Rho-123 + Rev205 e com Rho-123 + MK571, respectivamente (Gráficos 12B, 12C e 12D). Resultado semelhante foi observado para a cepa PH8 (R), onde as culturas marcadas apenas com Rho

123, com Rho-123 + Rev205 e com Rho-123 + MK571 apresentaram MIF de $843,7 \pm 52,25$; $845 \pm 49,15$ e $946,3 \pm 18,48$, respectivamente (Gráficos 12F, 12G e 12H). Adicionalmente, observou-se que não houve diferenças nas MIF quando comparamos as culturas de PH8 (S) e PH8 (R), tanto na presença quanto na ausência da Rho-123 e/ou bloqueadores, descartando, assim, o envolvimento das bombas Pgp e MRP no processo de resistência ao Sb^{III} em nossa cultura.

Transportadores ABC pertencentes às subfamílias ABCB, ABCC e ABCG tem sido associados com a resistência a drogas em *Leishmania* (FRÉZARD et al., 2014). A resistência ao antimonial é frequentemente associada com a superexpressão do transportador MRPA (ABCC3), onde esse transportador está envolvido no sequestro de Sb^{III} conjugados com tiols para o interior de vesículas (LÉGARÉ et al., 2001; FRÉZARD et al., 2014). Contudo, a presença de uma bomba de efluxo de metal-tiols na membrana plasmática também vêm sendo especulada (DEY et al., 1994), sendo recentemente associada ao meio transportador ABCI4 presente em *Leishmania (L.) major* (MANZANO et al., 2013).

A presença de genes semelhantes ao da família MDR1 foi observada em *Leishmania* sendo associada ao fenótipo de resistência (HENDRICKSON et al., 1993; MESSARITAKIS et al., 2013). O transportador Pgp 170, estudado em *L. (L.) donovani* e *L. (L.) infantum*, foi encontrado em maior concentração em isolados resistentes, que quando expostos ao Sb^V , tiveram o seu número de bombas aumentados (MESSARITAKIS et al., 2013). Adicionalmente, análises de *western blot* revelaram que transportadores homólogos a Pgp estão aumentados em cepas de *L. (V.) guyanensis* e *L. (L.) amazonensis* resistentes ao Sb^{III} (MOREIRA et al., 2013).

Gráfico 12 – Atividade dos transportadores ABC em formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* sensível e resistente ao antimonial trivalente.



Fonte: Elaboração própria. A atividade dos transportadores ABC homólogos ao Pgp e MRP foram avaliados utilizando os bloqueadores Reversina e MK571, respectivamente, em citômetro de fluxo sobre formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* sensível [PH8(S)] e resistente [PH8(R)] ao antimonial trivalente (Sb^{III}). (A) autofluorescência de PH8(S); (B) PH8(S) marcada com Rhodamina 123; (C) PH8(S) marcada com Rhodamina 123 + Reversina; (D) PH8(S) marcada com Rhodamina 123 + MK571; (E) autofluorescência de PH8(R) (F) PH8(R) marcada com Rhodamina 123; (G) PH8(R) marcada com Rhodamina 123 + Reversina; (H) PH8(R) marcada com Rhodamina 123 + MK571. Os resultados foram analisados pelo programa FlowJo, onde obteve-se os dados de média de intensidade de fluorescência. Os gráficos são representativos e correspondem a um experimento realizado.

Apesar de, nos últimos anos, vários estudos demonstrarem correlação entre o fenótipo de resistência a drogas em *Leishmania* com a presença de transportadores ABC, grande parte dessas pesquisas focam na expressão gênica dos transportadores, sendo poucos estudos realizados acerca da atividade dessas bombas de efluxo. Para esses estudos funcionais são utilizados substratos específicos para transportadores ABC, como Rho123 para análise de transportadores Pgp e Calceína-AM para MPR, além de bloqueadores específicos (MESSARITAKIS et al., 2013; RAI et al., 2013).

Em 2009, Mandal e colaboradores observaram que isolados de *L. (L.) donovani* resistentes ao antimonial apresentaram menor acúmulo de calceína, sendo que este acúmulo foi aumentado após utilização do inibidor de MRP probenecida e também após depleção de ATP, sugerindo a presença de bombas tipo-MRP nesses parasitas. Não foi observada, nestes isolados, correlação com o uso do substrato Rho-123 ou bloqueadores de MDR, indicando a ausência desse tipo de bomba de efluxo (MANDAL et al., 2009). Contudo, Rai e colaboradores (2013) estudando também isolados de *L. (L.) donovani* observaram atividade de transportadores Pgp através de um menor acúmulo de Rho-123 no interior dos parasitas resistentes e da atividade dos bloqueadores de Pgp, verapamil e TFP. Adicionalmente, eles também verificaram uma maior expressão de ATPase tipo-P de membrana e do transportador MRPA (RAI et al., 2013). Dessa forma, observa-se que diferentes linhagens de *Leishmania*, mesmo sendo da mesma espécie, podem apresentar mecanismos de resistência diferentes, sendo este fenótipo multifatorial.

Com isso, apesar de não ter sido observado, em nosso modelo experimental, a atividade de bombas de efluxo, seria necessário estudos adicionais acerca da expressão gênica desses transportadores nos parasitas resistentes para a confirmação de sua participação nesse fenótipo. Adicionalmente, o fenótipo de resistência em nossa linhagem de *L. (L.) amazonensis* poderia estar associado a outros transportadores da superfamília ABC descritos para *Leishmania* (LÉGARÉ et al., 2001; FRÉZARD et al., 2011), e/ou uma menor expressão de AQP1, visto que a superexpressão desse transportador, responsável pela entrada de Sb^{III} no parasita, induz sensibilidade

ao antimonial em diversas espécies de *Leishmania* (GOURBAL et al. 2004; MARQUIS et al. 2005), além da deleção de seu gene existir em cepas resistentes ao Sb^{III} de *L. (L.) major* (MUKHERJEE et al. 2013) e *L. (V.) guyanensis* (MONTE-NETO et al., 2015).

4.4.5. Análise do perfil de metilação global de DNA de *L. (L.) amazonensis* resistentes ao antimonial trivalente

Outro mecanismo que pode conferir resistência ao parasita é o seu perfil de expressão gênica, que por sua vez pode ser regulado pela metilação do DNA. A adição de um grupo metil em resíduos de citosinas nas ilhas CpG (regiões ricas em dinucleotídeos CG) é um dos principais mecanismos epigenéticos realizados pelos eucariotos, sendo as enzimas denominadas DNA metiltransferases responsáveis por este processo através da utilização do doador de metil S-adenosilmetionina (SAM) (PONGER; LI, 2005; LOENEN, 2006; YI, 2012).

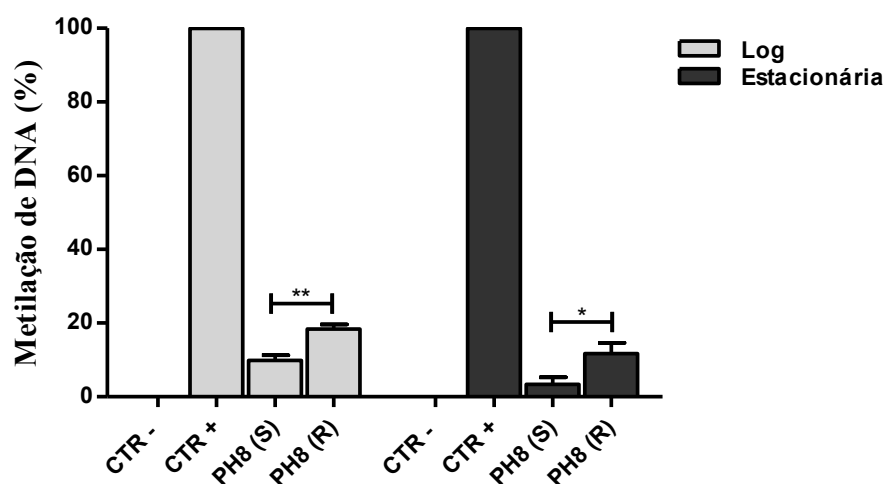
Em eucariotos superiores a adição de um radical metil geralmente esta associado a inibição da expressão gênica de determinado gene, visto que as ilhas CpG estão localizadas na região promotora do gene e sua metilação irá inibir sua transcrição (PONGER; LI, 2005). Contudo, em eucariotos inferiores a metilação do DNA pode ocorrer em regiões intragênicas e estar associada a expressão gênica, sendo responsável por diferentes processos biológicos resultando em diferentes funções adaptativas (PONGER; LI, 2005). Esse mecanismo epigenético vem sendo observado em invertebrados, fungos, protozoários e em todas as plantas superiores e vertebrados, contudo, alguns organismos como *Saccharomyces cerevisiae*, *Schizosaccharomyces pombe* e *Caenorhabditis elegans* não apresentam metilação detectável (PONGER; LI, 2005).

O perfil de metilação global de DNA das linhagens sensível e resistente de *L. (L.) amazonensis* foi avaliado tanto com as culturas em fase logarítmica quanto em fase estacionária de crescimento. Os resultados dos níveis de metilação estão apresentados no gráfico 13.

Observou-se que o nível de metilação na linhagem resistente foi maior quando comparado ao seu par sensível, em ambas as fases de crescimento da

cultura. Verificou-se na fase log de crescimento que a cultura PH8 (S) apresentou $9,84 \pm 2,58\%$ de DNA metilado, enquanto seu par resistente apresentou $18,40 \pm 2,12\%$. Durante a fase estacionária de crescimento, onde existem predominantemente formas promastigotas metacíclicas, a porcentagem de DNA metilado foi de $3,38 \pm 3,36\%$ e $11,7 \pm 5,04\%$ para as culturas PH8 (S) e PH8 (R), respectivamente (Gráfico 13).

Gráfico 13 – Nível de metilação global de DNA (%) de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* sensível e resistente ao antimonial trivalente.



Fonte: Elaboração própria. Foi realizada a extração de DNA genômico de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* sensível [PH8(S)] e resistente [PH8(R)] ao antimonial trivalente (Sb^{III}), em fase log (A) e estacionária (B) de crescimento. Em seguida, o DNA total foi analisado quanto a porcentagem de DNA total metilado através do Kit Epigentek®. Foi realizado o teste *t-student*, sendo $*p \leq 0,05$ e $**p \leq 0,01$.

Em 2012, Walker e colaboradores verificaram que *L. (L.) panamensis* resistentes ao Sb^{III} apresentaram uma superexpressão da enzima S-adenosilmetionina sintetase. Essa enzima está envolvida na síntese de precursores da tripanotona (tiol geralmente superexpresso em linhagens resistentes), contudo, também é responsável pela síntese do doador metil S-adenosilmetionina utilizado pelas DNA metiltransferases na metilação do DNA, sugerindo que mecanismos epigenéticos possam estar presentes na regulação gênica de vias metabólicas relacionadas a resistência nesses parasitas (WALKER

et al., 2012). Ainda, estudos anteriores mostraram que no protozoário *Entamoeba histolytica* há uma correlação entre a virulência desse parasita e a expressão gênica da DNA metiltransferase 2 (homólogo à metiltransferase humana) (FISHER et al., 2004). Nesse último trabalho, os parasitas cultivados na presença do agente desmetilante AzaC tiveram menor poder de infecção em hamsters, cujas lesões foram menores quando comparada às grandes lesões necrosadas provocadas pelo controle (FISHER et al., 2004).

No ano de 2006, Fisher e colaboradores verificaram que a superexpressão da DNA metiltransferase em *E. histolytica* induziu maior expressão de proteínas de choque térmico 70 (HSP70) e resistência ao estresse oxidativo, demonstrando que a metilação do DNA nesses patógenos induzem a expressão de genes, diferente do que ocorre com células de mamíferos. De fato, também foi observada uma correlação positiva entre metilação de DNA e expressão gênica em ostras *Crassostrea gigas* (GAVERY; ROBERTS, 2013; RIVIERE, 2014).

Baseado nesses fatos e nos nossos resultados, é possível inferir que a metilação de DNA pode ser um mecanismo importante nesses protozoários, podendo estar associada a virulência bem como a resistência à drogas. Esses dados sugerem que o processo de metilação de DNA pode estar associado positivamente com a regulação gênica em *Leishmania*, semelhante ao que foi observado em outros organismos (FISHER et al., 2004; GAVERY; ROBERTS, 2013; RIVIERE, 2014), especialmente de genes relacionados com o fenótipo de resistência a drogas e virulência. Contudo, estudos adicionais que demonstrem a presença de regiões metiladas em genes específicos e sua expressão necessitam serem realizados para confirmação desta hipótese.

No entanto, a relação entre metilação de DNA e expressão gênica em protozoários ainda é incerta, ou parece depender da região do DNA em que ocorre. A metilação em *E. histolytica* tem efeito limitado na expressão de genes, visto que quando os protozoários foram tratados com o agente desmetilante apenas 2,1% dos genes foram modulados (68 genes foram regulados negativamente e 131 genes foram superexpressos). Dentre os genes inibidos com a desmetilação estão alguns que codificam proteínas envolvidas na patogênese da ameba (ALI et al., 2007). Em *Plasmodium falciparum*, agente etiológico da

malária, também foi observado sequencias metiladas em seu DNA e a presença da enzima DNA metiltransferase (PONTES, 2013). Contudo, verificou-se uma relação negativa entre a metilação e abundância de mRNA, onde genes altamente expressos estão hipometilados enquanto genes fracamente expressos aparecem hipermetilados, demonstrando assim que a metilação intragênica pode estar regulando a expressão de genes nesses protozoários (PONTES, 2013). Como mencionado anteriormente, para o gênero *Leishmania* ainda nada se sabe sobre a relação entre metilação de DNA e expressão gênica.

Nos últimos anos vêm sendo evidenciado a presença de mecanismos epigenéticos na expressão gênica de Tripanossomatídeos, contudo, os principais estudos são acerca de modificações pós-transcricionais de histonas, dentre elas acetilação e metilação dessas proteínas, já observados em *Trypanossoma brucei*, *Trypanossoma cruzi* e *Leishmania (L.) major* (FIGUEIREDO et al., 2009; MARTINEZ-CALVILLO et al., 2010). Adicionalmente, a presença da enzima DNA metiltransferase, relacionada a metilação do DNA, denominada *dnmt6* (diferente das presentes na maioria das plantas, metazoa e fungos, denominadas *dnmt1* e *dnmt2*) foi observado em *T. brucei* e *L. (L.) major* apesar do resultado biológico disso ainda não ser esclarecido (PONGER; LI, 2005). O presente estudo, o primeiro a reportar o perfil de metilação global em *Leishmania*, detectou níveis de metilação entre 3,38 à 18,40% em cepas sensíveis e resistentes ao Sb^{III} nas fases logarítmica e estacionária. Um estudo recente observou 33% de metilação no protozoário *Perkinsus* mantido em cultura (FARIAS et al., 2017).

Interessantemente, no presente trabalho os parasitas em fase logarítmica de crescimento apresentaram maiores níveis de metilação quando comparados aos parasitas na fase estacionária de crescimento, tanto para a linhagem sensível ($p = 0,029$) quanto para a linhagem resistente ($p = 0,046$) (Gráfico 13). Estudos de transcriptômica e metabolômica demonstram que o processo de metaciclogênese direciona modificações específicas no volume de RNA e proteínas desses parasitas, que passam de um estágio altamente replicativo (procíclico, predominante na fase log) para um estágio não-replicativo (metacíclicas, predominante na fase estacionária) (PABLO; FERREIRA; WALRAD, 2016). De fato, em 2015, Kloehn e colaboradores observaram que formas promastigotas

metacíclicas de *L. (L.) mexicana* são caracterizadas por uma redução de 4-6 vezes no volume de RNA, proteínas e lipídios total em comparação com a fase promastigota procíclicas. Esses dados reforçam a hipótese de que o processo de metilação pode estar associado positivamente com a regulação gênica em parasitas do gênero *Leishmania*.

Verificou-se que parasitas do gênero *Leishmania* conseguem realizar modificações epigenéticas no genoma do macrófago infectado, com significativas mudanças no perfil de metilação em sítios CpG específicos de diversos genes envolvidos na via de ativação destes macrófagos, inibindo sua atividade microbicida (MARR et al., 2014; DUQUE; DESCOTEAUX, 2015; MCMASTER, 2016). Recentemente foi observado também que a infecção de ostras pelo protozoário do gênero *Perkinsus* estava associada à alterações no perfil de metilação global do hospedeiro (FARIAS et al., 2017). Contudo, estudos que analisam o perfil de metilação do parasita são escassos na literatura.

Dessa forma, esse é o primeiro estudo a mostrar o perfil de metilação global em *Leishmania* e sua associação com a resistência ao antimonial trivalente (Sb^{III}), demonstrando que o maior nível de metilação pode ser um mecanismo vantajoso para a virulência do parasita e a resposta à drogas.

4.4.6. Atividade da licarina A sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* resistente ao antimonial trivalente

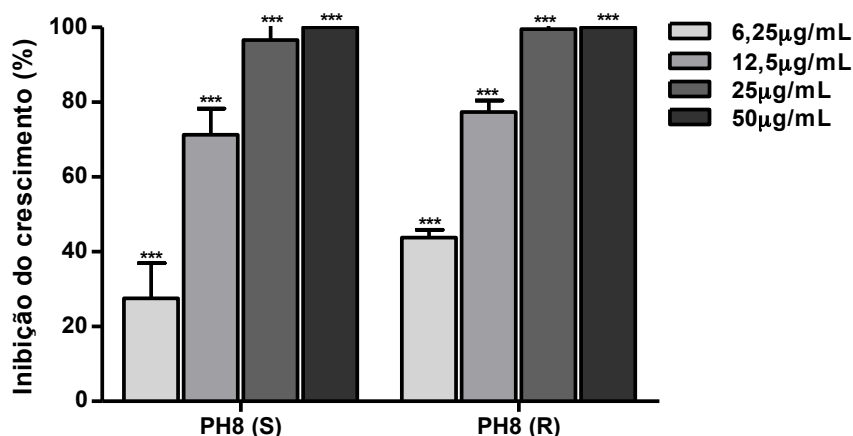
Após obtenção e conhecimento do comportamento da cepa de *L. (L.) amazonensis* resistente ao antimonial trivalente, onde verificou-se que esta apresenta-se mais virulenta *in vitro* e *in vivo* quando comparada com a cepa sensível, com maior porcentagem de DNA metilado, além de apresentar-se mais resistente à lise pelo complemento (FRADE, 2016), foi avaliado se a licarina A apresenta também atividade sobre essa linhagem resistente.

Observou-se que a licarina A apresenta atividade antipromastigota sobre PH8(S) e PH8(R), inibindo o crescimento dessas linhagens de forma semelhante (Gráfico 14). Para a linhagem sensível, observou-se uma inibição de crescimento

de $27,53 \pm 5,45$; $71,26 \pm 4,07$; $96,61 \pm 3,34$ e 100% para as concentrações de 6,35; 12,5; 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, quando comparadas ao controle. Isso resultou em uma CI_{50} de 10,16 $\mu\text{g/mL}$ para a cultura PH8 (S) (Gráfico 14). Quando a linhagem resistente foi avaliada, verificou-se que também a partir da concentração de 6,25 já houve inibição do crescimento ($40,79 \pm 1,19\%$), sendo esta inibição concentração dependente. Para as concentrações de 12,5; 25 e 50 $\mu\text{g/mL}$ obteve-se inibições de $77,34 \pm 1,81$; $99,53 \pm 0,31$ e 100%, respectivamente, em relação ao controle (Gráfico 14), resultando em uma CI_{50} de 8,96 $\mu\text{g/mL}$ para PH8 (R).

Os valores de CI_{50} da licarina A semelhantes para as linhagens de *L. (L.) amazonensis* sensíveis e resistentes ao Sb^{III} demonstrou que não existe resistência cruzada para essas drogas, provavelmente por não apresentarem o mesmo mecanismo de ação do antimonial sobre as formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*.

Gráfico 14 – Inibição do crescimento das formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* sensível e resistente ao antimônio trivalente na presença de diferentes concentrações da Licarina A.

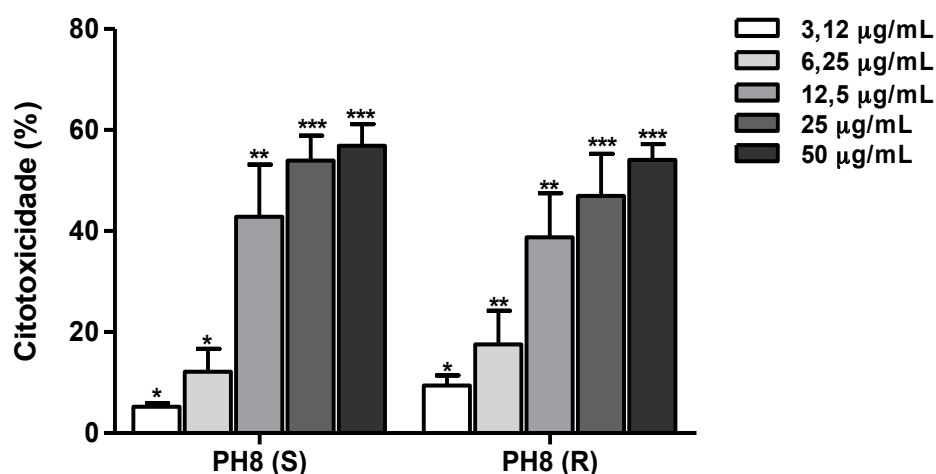


Fonte: Elaboração própria. As formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (1×10^6 células/mL) sensível [PH8(S)] e resistente [PH8(R)] foram cultivadas em meio Schneider completo por 72 horas à 26°C, na presença da licarina A. Após 72h, as culturas foram quantificadas em câmara de Neubauer sob microscopia óptica comum. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média detréis experimentos independentes realizados em duplicata. Foi realizado o teste *t-student*, sendo *** $p \leq 0,001$ em comparação ao controle.

De forma semelhante, quando analisada sobre formas amastigotas axênicas, a licarina A apresentou eficácia similar sobre as cepas sensível e resistente ao Sb^{III} (Gráfico 15). Para as culturas sensível e resistente, observa-se que a partir da menor concentração testada (3,12 µg/mL) houve morte celular quando comparadas ao controle, sendo de $5,23 \pm 0,72$ e $9,4 \pm 2,05\%$ para PH8 (S) e PH8 (R), respectivamente (Gráfico 15). Para as concentrações de 6,25; 12,5; 25 e 50 µg/mL da licarina A as taxas de morte celular foram de $12,15 \pm 4,52$; $42,85 \pm 10,32$; $53,97 \pm 4,91$ e $56,89 \pm 4,28\%$ para a cultura sensível, e de $17,54$; $38,73 \pm 8,76$; $46,95 \pm 8,37$ e $54,08 \pm 3,71\%$ para a cepa resistente, respectivamente, quando comparadas ao controle (Gráfico 15).

Esses dados resultaram em valores de CE₅₀ de 23,92 e 24,79 µg/mL para PH8(S) e PH8(R), respectivamente. Similar ao observado nos ensaios antipromastigota, a licarina A também não apresentou resistência cruzada para as amastigotas axênicas derivadas das linhagens sensível e resistente.

Gráfico 15 – Citotoxicidade da licarina A sobre formas amastigotas axênicas de *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* sensível e resistente ao antimônio trivalente.



Fonte: Elaboração própria. As formas amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis* (1×10^6 células/mL) sensível [PH8(S)] e resistente [PH8(R)] ao antimônio trivalente foram cultivadas em meio Schneider completo por 24 horas à 26°C, na presença da licarina A. Após 24h, a viabilidade celular foi analisada pelo método de MTT. O gráfico representa a média ± erro padrão da média de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. Foi realizado o teste *t-student*, sendo * $p \leq 0,05$; ** $p \leq 0,01$ e *** $p \leq 0,001$ em comparação ao controle.

Na tabela 3 estão expostos os resultados de CI_{50} e CE_{50} das substâncias licarina A, anfotericina B e antimonial trivalente. Além de verificarmos que a cepa resistente ao Sb^{III} não apresenta resistência cruzada com a licarina A, observa-se que ela também não apresenta resistência cruzada com a anfotericina B, visto que os valores de CI_{50} e CE_{50} para as formas promastigotas e amastigotas de ambas linhagens são similares (0,13 $\mu\text{g/mL}$ para ambas) (Tabela 3).

Analisando os resultados para o antimônio trivalente, confirmou-se que as formas promastigotas de PH8 (R) apresentaram um índice de resistência de 18,7 quando comparadas com a PH8 (S). Para as amastigotas axênicas, observou-se que a linhagem resistente continua apresentando um determinado índice de resistência, contudo, esse foi parcialmente revertido durante a transformação das promastigotas em amastigotas axênicas, sendo agora de 8,02 (Tabela 3).

Tabela 3. Concentração inibitória de 50% do crescimento (CI_{50}) de promastigotas e concentração efetiva de 50% (CE_{50}) de amastigotas axênicas de *L. (L.) amazonensis* sensível [PH8(S)] e resistente [PH8(R)] ao antimônio trivalente da Licarina A, Antimonial trivalente e Anfotericina B.

	Promastigotas (CI_{50}) $\mu\text{g/mL}$		Amastigotas (CE_{50}) $\mu\text{g/mL}$	
	PH8 (S)	PH8 (R)	PH8 (S)	PH8 (R)
Licarina A	10,16	8,96	23,92	24,79
Antimonial trivalente	12,21	228,99	17,58	141,06
Anfotericina B	0,13	0,13	0,21	0,27

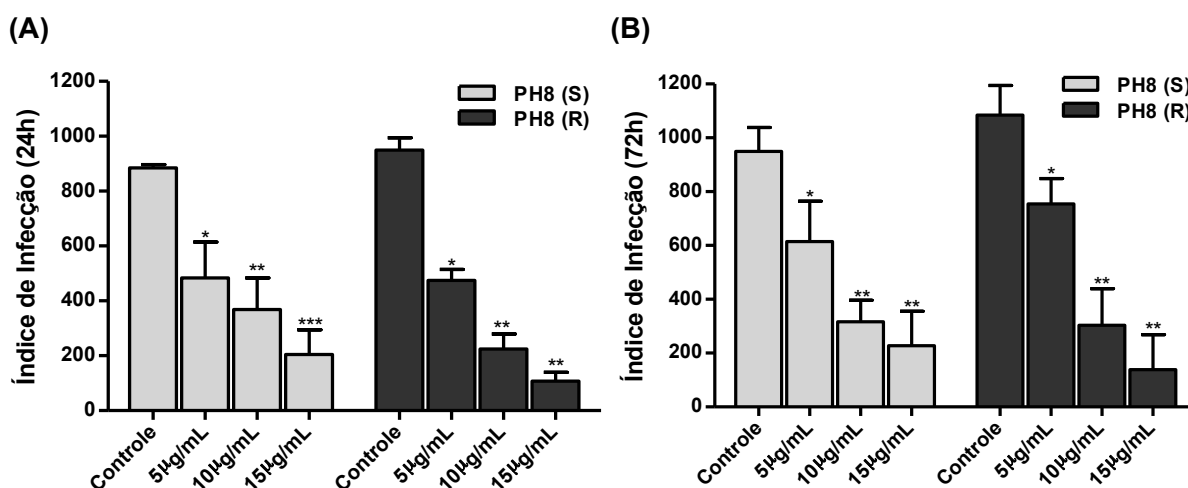
Fonte: Elaboração própria

Os valores de CI_{50} apresentados para as formas promastigotas sensível e resistente ao Sb^{III} foram inferiores daqueles os obtidos para as cepas de *L. (L.) amazonensis* selvagem com baixo número de repiques, observado no gráfico 1 deste trabalho. Provavelmente isso deve-se as metodologias utilizadas para ambos os ensaios. Inicialmente foi utilizada o ensaio de MTT para a análise da atividade antipromastigota e anti-amastigota da licarina A, contudo para os ensaios com as cepas sensível e resistente utilizou-se a técnica de quantificação direta câmara de Neubauer. Neste momento, em que busca-se compreender o nível de resistência obtido pelos parasitas, foi selecionado este ensaio visto ele

ser mais sensível quando comparado com o teste colorimétrico de MTT, o que pode ser confirmado pelos resultados obtidos no presente trabalho e em outros estudos realizados pelo nosso grupo de pesquisa (MONTE-NETO et al., 2008).

Na última análise da atividade antileishmania da licarina A sobre a linhagem resistente ao Sb^{III}, verificou-se que essa neolignana também foi eficaz sobre formas amastigotas intracelulares (Gráfico 16). O tratamento da neolignana durante 24 horas sobre macrófagos infectados com PH8 (S) induziu uma redução de 45,40; 58,37 e 76,84% nas concentrações de 5, 10 e 15 µg/mL, respectivamente, quando comparados ao controle (Gráfico 16A). Para a linhagem resistente, essa redução do índice de infecção foi de 50% (5 µg/mL), 76,36% (10 µg/mL) e 88,30% (15 µg/mL) quando comparados ao controle (Gráfico 16A). Resultado semelhante foi observado para o tratamento de 72 horas, onde as concentrações de 5, 10 e 15 µg/mL da licarina A induziu uma redução de 35,3; 66,68 e 76,08%, respectivamente, para macrófagos infectados com PH8(S), e de 30,38% (5 µg/mL), 72,01% (10 µg/mL) e 87,24% (15 µg/mL) para as células infectadas com PH8 (R) (Gráfico 16B).

Gráfico 16 – Efeito da Licarina A sobre o índice de infecção de macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* sensível e resistente ao antimônio trivalente.



Fonte: Elaboração própria. Os MØ murinos foram infectados com promastigotas de *L. (L.) amazonensis* sensível [PH8(S)] e resistente [PH8(R)] ao antimônio trivalente na proporção de 10 promastigotas:1MØ e incubados na ausência [controle] ou presença de diferentes concentrações da Licarina A durante 24 e 72 horas, em estufa de 5% de CO₂ a 37°C. O gráfico representa a média ± erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em duplicata. Foi realizado o teste *t-student*, sendo **p* ≤ 0,05; ***p* ≤ 0,01; ****p* ≤ 0,001 em comparação ao controle.

Visto o surgimento emergente de cepas resistentes de *Leishmania* ao antimonial pentavalente em diversas regiões (SUNDAR et al., 2001; MOHAPATRA, 2014), aliado a escassez de um arsenal quimioterápico para as leishmanioses, torna-se necessário a pesquisa de novos fármacos que também sejam efetivos sobre essas parasitas com fenótipo de resistência.

Naftoquinonas sintéticas demonstraram atividade sobre linhagens de *L. (L.) chagasi* e *L. (L.) amazonensis* sensíveis e resistentes ao Sb^{III}, onde dentre 28 moléculas analisadas apenas uma apresentou resistência cruzada com o Sb^{III}, tendo seus valores de CI₅₀ aumentados para as linhagens resistentes, provavelmente devido ao seu mecanismo de ação molecular ser semelhante ao do antimonial pela inibição da tripanotona redutase (GUIMARÃES et al., 2013).

Estudos que avaliam nanopartículas carregadas com drogas também vem demonstrando atividade sobre linhagens resistentes a drogas. Em 2013, Mondal e colaboradores observaram que nanopartículas (TPGS) carregadas com a lactona andrografolida apresentou atividade sobre amastigotas de *L. (L.) donovani* sensíveis e resistentes ao Sb^V ou paramomicina superior aquela apresentada apenas pela lactona. Em 2016, Bhattacharya e colaboradores verificaram que o aristolactano piperolactam A, isolado de *Piper betle*, carregado por nanopartícula (HPBCD) também apresentou atividade antileishmania sobre amastigotas axênicas e intracelulares de *L. (L.) donovani* resistente ao Sb^V e paramomicina. Neste último trabalho foi observado resistência cruzada nas linhagens resistentes entre as drogas Sb^V e paramomicina (BHATTACHARYA et al., 2016). De forma semelhante, um carreador lipídico nanoestruturado (NLC) carregado com sesquiterpeno cedrol apresentou semelhante atividade *in vitro* sobre cepas de *L. (L.) donovani* resistentes ao Sb^V ou paramomicina, assim como atividade *in vivo* sobre camundongos BALB/c infectados com essas linhagens resistentes (KAR et al., 2017).

Nosso grupo de pesquisa também demonstrou a atividade de diversos compostos sintéticos sobre nossa linhagem de *L. (L.) amazonensis* resistente ao Sb^{III}. Diversos derivados tiofênicos indólicos avaliados sobre formas promastigotas e amastigotas intracelulares das linhagens sensível e resistente apresentaram valores de CI₅₀ e CE₅₀ semelhantes, sugerindo uma baixa resistência cruzada para os derivados tiofênicos (FÉLIX et al., 2016;

RODRIGUES, 2017). Visto que a licarina A também apresentou-se eficaz sobre *L. (L.) amazonensis* resistente ao Sb^{III}, não apresentando resistência cruzada, torna-se interessante futuras investigações em modelos *in vivo* utilizando cepas resistentes aos antimoniais.

4.5. Análise da atividade biológica da licarina A associada ao ácido ascórbico na terapêutica da leishmaniose experimental cutânea

Em estudos anteriores realizados em nosso laboratório, observou-se que o tratamento oral com a licarina A sobre camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) amazonensis* não diminuiu as lesões dos animais, tanto para a dose de 20 mg/kg/dia quanto para a de 100 mg/kg/dia (NÉRIS, 2012). No entanto, observou-se que a menor dose da licarina A analisada (20 mg/kg/dia) induziu uma diminuição da carga parasitária no baço dos animais, demonstrando um efeito protetor da licarina A no processo de visceralização da doença nesse modelo de infecção experimental. Contudo, os animais tratados com a dose de 100 mg/kg/dia apresentaram queda progressiva de pelo, além de aspecto debilitado, sugerindo uma toxicidade desta neolignana nessas condições experimentais (NÉRIS, 2012).

O ácido ascórbico (AA) é um agente redutor que age como cofator de diversas enzimas, incluindo aquelas envolvidas na síntese de colágeno e de neurotransmissores, além de estar envolvido em atividades não-enzimáticas, como por exemplo, auxiliando a absorção de ferro e efeitos antioxidantes (CHEN et al., 2015; HEMILA, 2017). Devido suas propriedades, a associação do ácido ascórbico à diversas drogas vêm sendo correlacionada a uma redução na toxicidade desses fármacos, principalmente em antineoplásicos, devido a capacidade dessa vitamina em inibir o estresse oxidativo (SHARMA; SEHGAL; KAUR, 2012; WU et al., 2015; CHEN et al., 2015). Dessa forma, sugerimos a hipótese de que o ácido ascórbico poderia prevenir algum efeito tóxico que possa estar associado à utilização desta neolignana. Para isso, a atividade antileishmania da licarina A em uma dose intermediária, de 50 mg/kg/dia, foi

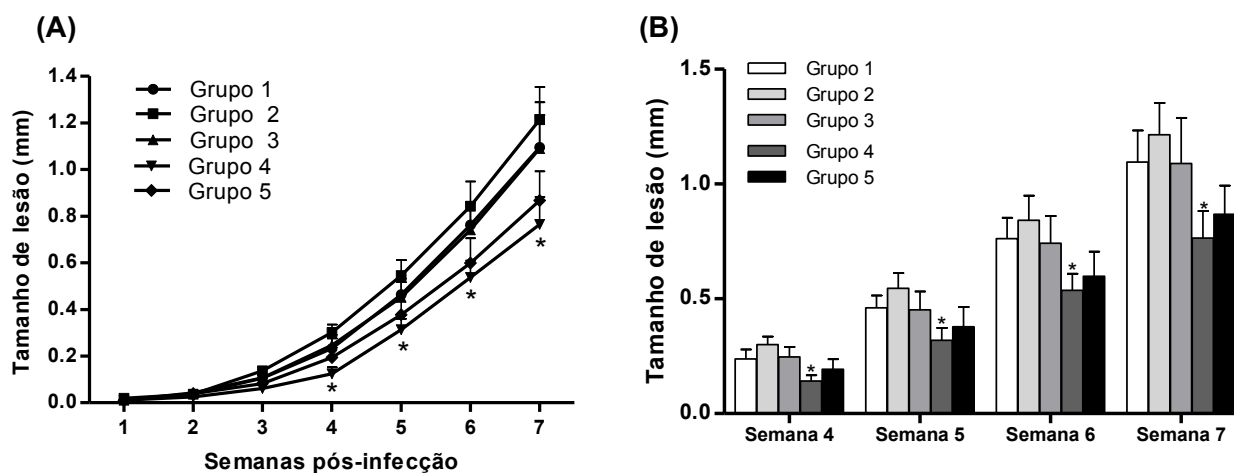
avaliada em associação com o ácido ascórbico em camundongos *Swiss* infectados com *L. (L.) amazonensis* através da via oral de administração.

4.5.1. Efeito do tratamento da licarina A associada ao ácido ascórbico em camundongos *Swiss* infectados com *L. (L.) amazonensis*

A análise do efeito do tratamento da licarina A livre ou associada com o ácido ascórbico foi realizada em camundongos *Swiss* infectados com *L. (L.) amazonensis*, que receberam durante sete semanas o protocolo do tratamento exposto na tabela 1 presente no item 3.15.1 (material e métodos).

No gráfico 17 estão apresentados os resultados de tamanho da lesão durante sete semanas de experimentação após infecção dos animais. Observou-se que os animais infectados apresentaram um tamanho progressivo na lesão durante as semanas de tratamento (Gráfico 17A), contudo, a partir da quarta semana de tratamento os animais que receberam a combinação de licarina A + ácido ascórbico (Grupo 4) apresentaram menor tamanho de lesão quando comparados com o Grupo 1 (controle) (Gráfico 17A e 17B). Essa redução foi de 40,78% na quarta semana de experimentação e continuou até a sétima semana de tratamento, onde a redução da lesão foi de 35,20% em relação ao Grupo 1 (Gráfico 17B). Não foi observado sinais clínicos de toxicidade nos animais de experimentação, sendo os parâmetros de toxicidade melhores avaliados posteriormente. Foi observado, durante todo experimento *in vivo*, a morte de apenas um animal do Grupo 3.

Gráfico 17 – Efeito do tratamento com a licarina A e/ou ácido ascórbico no tamanho de lesão de camundongos *Swiss* infectados com *L. (L.) amazonensis*.

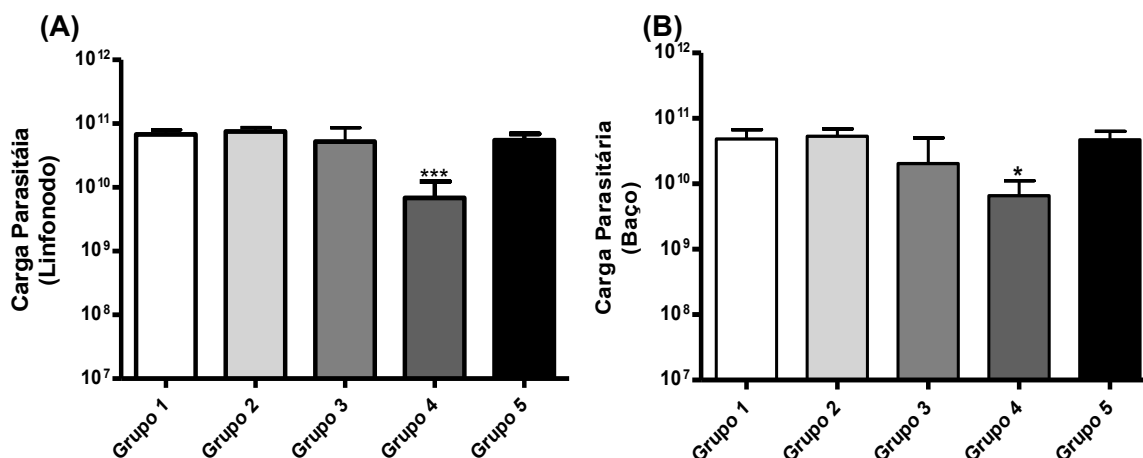


Fonte: Elaboração própria. Os camundongos *Swiss* foram pré-tratados com veículo (Grupo 1) ou ácido ascórbico (Grupos 2-5) durante 15 dias, sendo em seguida infectados com *L. (L.) amazonensis*. Após infecção os animais foram tratados com o veículo (Grupo 1 e 2), ácido ascórbico (Grupo 3), ácido ascórbico + licarina A (Grupo 4) e com apenas licarina A (Grupo 5) por via oral. A espessura da pata foi medida semanalmente, e a diferença entre a espessura das patas correspondeu ao tamanho da lesão. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média de cada grupo. Foi realizado *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo $*p \leq 0,05$ em comparação ao Grupo 1 – controle.

Ao final do experimento *in vivo*, após sete semanas de tratamento dos camundongos *Swiss* infectados com *L. (L.) amazonensis*, os animais foram anestesiados para coleta do sangue periférico para análises toxicológicas, e a pata infectada com lesão, linfonodo poplíteo direito e baço foram coletados. As patas coletadas foram armazenadas em formol 10% para posterior avaliação histológica, e a carga parasitária linfonodo poplíteo direito e baço foram analisadas pelo método de diluição limitante (OLIVEIRA et al., 2005).

Os resultados de carga parasitária estão expostos no gráfico 18. Observou-se que os animais tratados com a ácido ascórbico + licarina A (Grupo 4), além de apresentarem menor tamanho de lesão quando comparados ao Grupo 1 (controle), exibiram uma menor carga parasitária tanto no linfonodo poplíteo (Gráfico 18A) quanto no baço (Gráfico 18B).

Gráfico 18 – Efeito do tratamento da licarina A e/ou ácido ascórbico na carga parasitária do linfonodo poplíteo e baço em camundongos Swiss infectados com *L. (L.) amazonensis*.



Fonte: Elaboração própria. Camundongos Swiss foram pré-tratados com veículo (Grupo 1) ou ácido ascórbico (Grupos 2-5) durante 15 dias, sendo em seguida infectados com *L. (L.) amazonensis*. Após infecção os animais foram tratados com o veículo (Grupo 1 e 2), Ácido ascórbico (Grupo 3), ácido ascórbico + licarina A (Grupo 4) e com apenas licarina A (Grupo 5) por via oral. Após o fim do tratamento, os animais foram eutanasiados e a carga parasitária do linfonodo poplíteo direito (A) e do baço (B) foram analisadas pelo método de diluição limitante. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média de cada grupo. Foi realizado *One-way ANOVA* seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo $*p \leq 0,05$ e $***p \leq 0,001$ em comparação ao Grupo 1 – controle.

Em 2004, Garg e colaboradores observaram que a ingestão profilática de ácido ascórbico diminuiu a carga parasitária de hamsters infectados com *L. (L.) donovani*, além de aumentar a eficácia do estibogluconato de sódio no tratamento após infecção. Contudo, a administração dessa associação (ácido ascórbico + estibogluconato de sódio) diminuiu a eficácia do antimonial pentavalente em animais com infecção já estabelecida (GARG et al., 2004). Neste mesmo ano, Sen e colaboradores (2004) verificaram a eficácia do ácido ascórbico como agente antioxidante sobre eritrócitos na terapia da anemia provocada pela infecção com *L. (L.) donovani* em hamsters.

Recentemente, dois estudos demonstraram o papel da associação do ácido ascórbico com drogas antileishmania em modelo experimental de leishmaniose visceral (CASTRO et al., 2014; KATO et al., 2014). Foi observado

que camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) infantum* e tratados com glucantime + ácido ascórbico apresentaram uma menor carga parasitária no baço quando comparados aos animais que receberam apenas o glucantime, contudo, não foi observado diferenças na carga parasitária dos fígados desses animais (KATO et al., 2014). Adicionalmente, Kato e colaboradores (2014) verificaram que o co-tratamento do glucantime + ácido ascórbico preveniu mudanças histopatológicas no fígado do animais quando comparados com aqueles que receberam apenas o glucantime, além de reduzir o índice de células em apoptose e a atividade da peroxidase como indicativo de estresse oxidativo dos hepatócitos. Esse efeito hepatoprotetor da vitamina C também foi observado em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) infantum* e tratados com Sb^{III} lipossomal + ácido ascórbico, através da redução do infiltrado celular e ausência de granulomas, além de um efeito protetor nos rins desses animais, apesar deste co-tratamento não influenciar no efeito antileishmania do Sb^{III} (CASTRO et al., 2014).

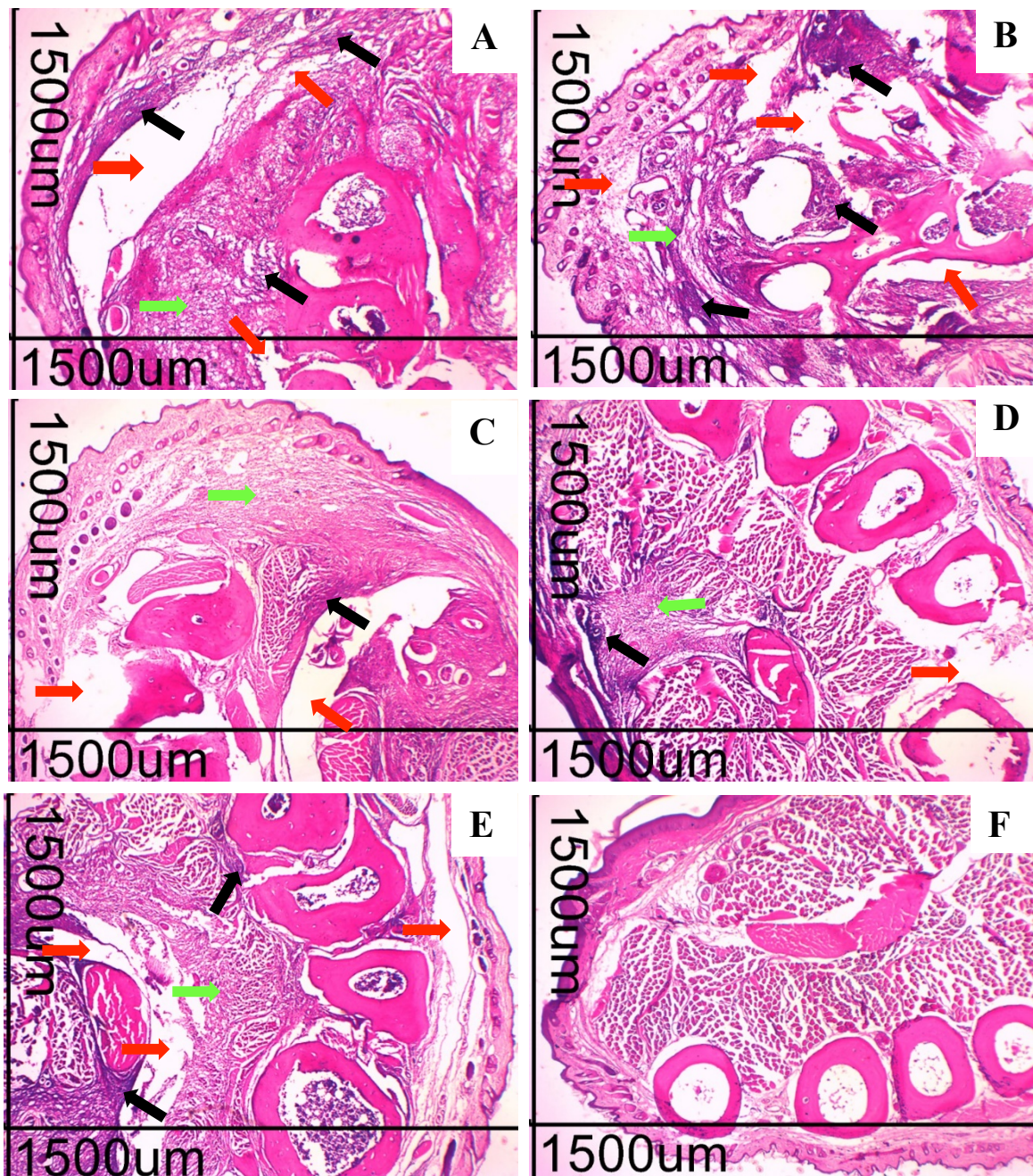
Dessa forma, visto que o ácido ascórbico conseguiu reduzir as alterações histológicas no fígado induzidas pelo tratamento com o antimonial pentavalente e também pelo antimonial trivalente (CASTRO et al., 2014; KATO et al., 2014), decidiu-se realizar uma análise histológica da lesão dos animais infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com a licarina A associado ao ácido ascórbico.

4.5.2. Análise histológica das patas de camundongos Swiss infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com licarina A associado ao ácido ascórbico.

Ao fim do tratamento *in vivo* realizado em camundongos Swiss infectados com *L. (L.) amazonensis*, as patas dos animais foram coletadas para análise histológica. Os resultados desta análise estão expostos nas figuras 12, 13 e 14.

A análise do grupo 1 (Figura 12A) revelou a presença de congestão e edema da derme e hipoderme, podendo ser observado espaçamentos e desorganização das fibras colágenas. Há dilatação de capilares linfáticos e presença de infiltrado leucocitário multifocal na derme e hipoderme. O grupo 2 (Figura 12B) apresentou edema, desorganização das fibras colágenas e presença de infiltrado leucocitário na derme e hipoderme. Com relação ao Grupo 3 (Figura 12C), observa-se uma reorganização das fibras colágenas, diminuição do edema e do infiltrado celular na derme. No entanto, o edema continua presente, assim como a desorganização das fibras colágenas e presença de infiltrado leucocitário na hipoderme. Na avaliação do Grupo 4 (Figura 12D), cujo tratamento apresentou atividade antileishmania, observa-se reorganização das fibras colágenas, diminuição do edema e do infiltrado celular na derme, hipoderme e entre as fibras musculares. O grupo 5 (Figura 12E) apesar de demonstrar reorganização das fibras colágenas e diminuição do infiltrado celular na derme, hipoderme e entre as fibras musculares, apresentou edema na região da hipoderme. O grupo 6 (figura 12F), que consiste nas patas de animais não infectados (controle sadio), apresenta aspecto histológico normal e histoarquitetura preservada.

Figura 12 – Fotomicrografias representativas das patas de camundongos Swiss infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com ácido ascórbico e/ou licarina A.



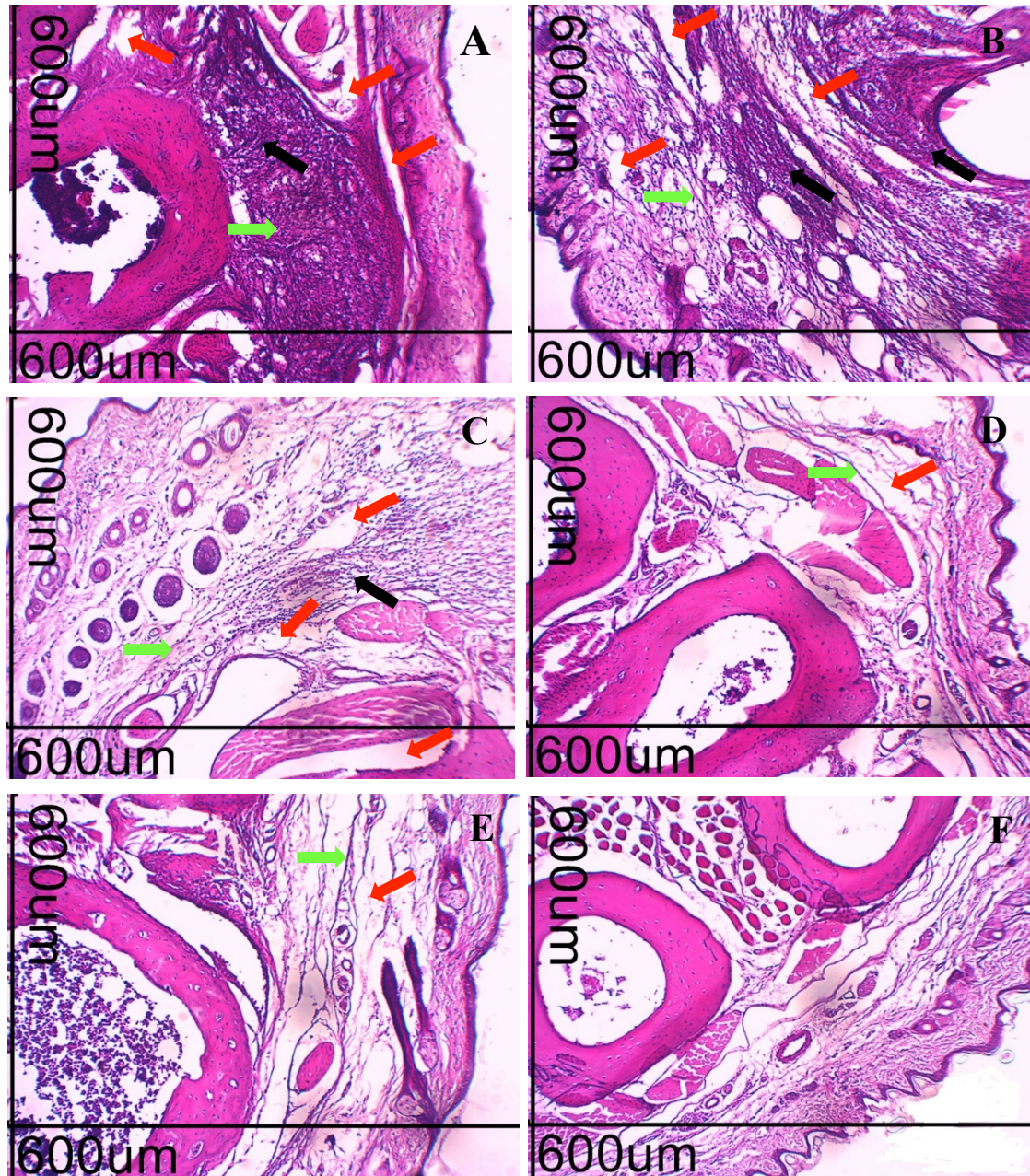
Fonte: Elaboração própria. Camundongos Swiss foram pré-tratados com ácido ascórbico durante 15 dias, sendo em seguida infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados Ácido ascórbico e/ou Licarina A por via oral. Ao fim do tratamento, os animais foram eutanasiados e as patas dos grupos experimentais: Grupo 1 (A), Grupo 2 (B), Grupo 3 (C), Grupo 4 (D), Grupo 5 (E) e Grupo 6 (F) foram coletadas e analisadas. Edema (seta vermelha), infiltrado leucocitário (seta preta) e fibras colágenas (seta verde). Fotomicrografias A, B, C, D, E e F – H&F, A.T. x40, 1500µm.

As lâminas das patas dos animais foram avaliadas em A.T. x100 (600µm), sendo possível capturar imagens da pata do lado recoberto por pele delgada (com pelos) (Figura 13) e por pele espessa (coxim plantar, sem pelo) (Figura 14).

No lado da pata recoberta por pele delgada (Figura 14), ao compararmos o grupo 1 (Figura 13A) com o grupo 6 (Figura 13F) foi visualizado como resultados da infecção por *L. (L.) amazonensis* um aumento aglomerado do infiltrado celular na derme e mais acentuadamente na hipoderme, promovendo uma desorganização das fibras colágenas e presença de edema. No grupo 2 (Figura 13B) o infiltrado leucocitário está presente na derme e hipoderme, além da presença de edema, dilatação de vasos linfáticos e desorganização das fibras colágenas. Quando o Grupo 3 foi avaliado (Figura 13C), observou-se que o infiltrado celular diminuiu promovendo uma reorganização das fibras colágenas, entretanto, continua presente o edema. Com relação aos animais do grupo 4 (Figura 13D), cujo tratamento funcionou, o infiltrado celular e o edema sofreram redução e as fibras colágenas estão reorganizadas a nível da derme e hipoderme. Os animais do grupo 5 (Figura 13E), apesar de ter sido promovido uma diminuição do infiltrado celular na derme e hipoderme, ainda apresentaram edema.

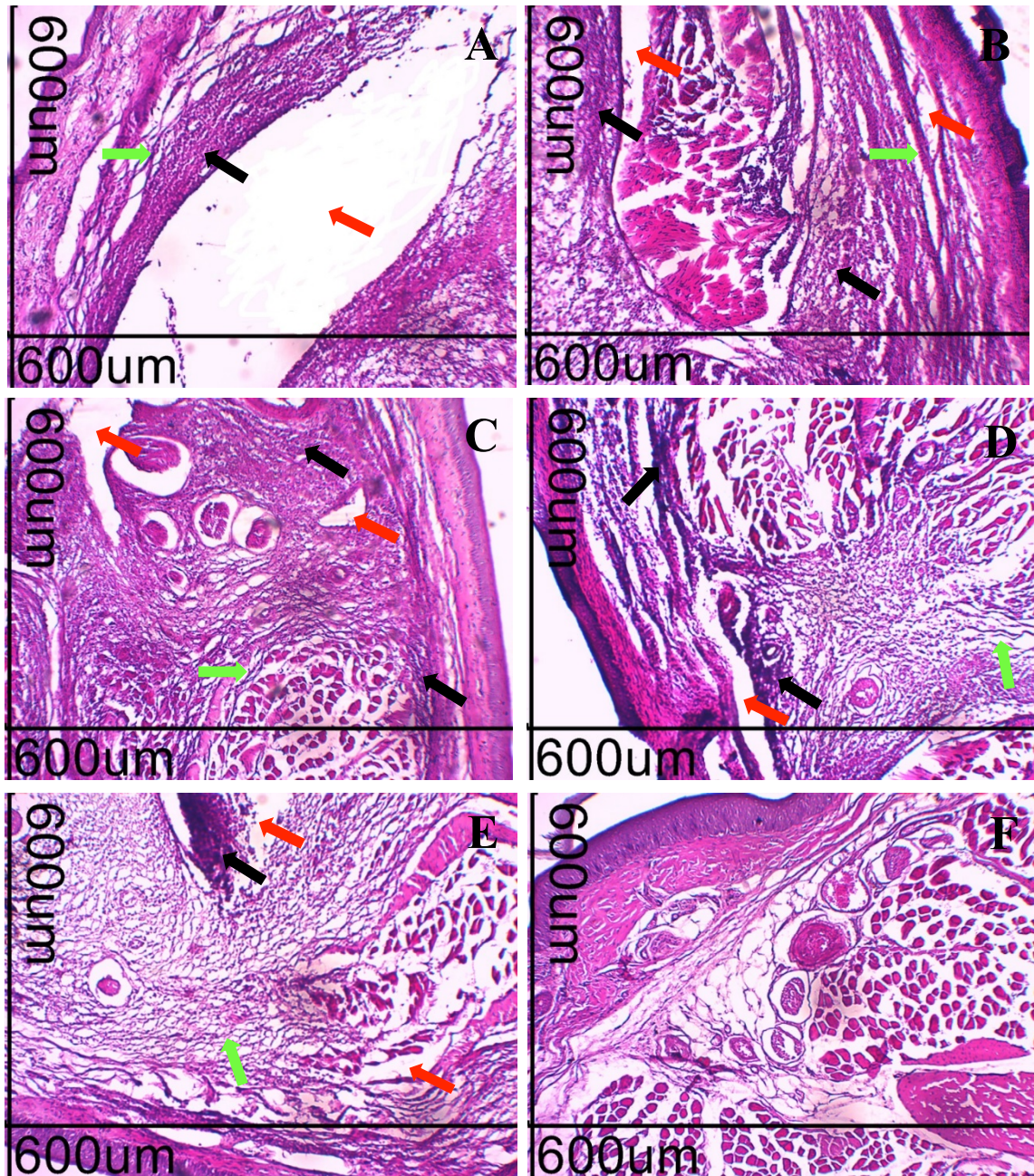
As fotomicrografias correspondentes ao lado da pata recoberta por pele espessa estão expostos na figura 14. Como resultado da infecção por parasitas de *L. (L.) amazonensis* verificou-se um aumento do infiltrado celular na derme e hipoderme e a formação de edema, promovendo uma desorganização das fibras colágenas, quando comparou-se os Grupos 1 (Figura 14A) com o Grupo 6 (Figura 14F). Para o Grupo 2 (Figura 14B) o infiltrado leucocitário está presente na derme e hipoderme, além de edema e desorganização das fibras colágenas. Os animais cujo tratamento foi realizado apenas com a administração do ácido ascórbico (grupo 3) verifica-se a presença de infiltrado celular, desorganização das fibras colágenas e edema (Figura 14C). Novamente, para os animais do Grupo 4 o infiltrado celular e o edema sofreram redução e as fibras colágenas estão reorganizadas a nível da derme e hipoderme (Figura 14D). O tratamento apenas com a licarina A apesar de ter promovido diminuição do infiltrado celular na derme e hipoderme dos animais (Grupo 5), estes ainda apresentaram edema (Figura 14E).

Figura 13 – Fotomicrografias representativas do lado da pata recoberta por pele delgada de camundongos Swiss infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com ácido ascórbico e/ou licarina A.



Fonte: Elaboração própria. Camundongos Swiss foram pré-tratados com ácido ascórbico durante 15 dias, sendo em seguida infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados ácido ascórbico e/ou licarina A por via oral. Ao fim do tratamento, os animais foram eutanasiados e as patas dos grupos experimentais: Grupo 1 (A), Grupo 2 (B), Grupo 3 (C), Grupo 4 (D), Grupo 5 (E) e Grupo 6 (F) foram coletadas e analisadas. Edema (seta vermelha), infiltrado leucocitário (seta preta) e fibras colágenas (seta verde). Fotomicrografias A, B, C, D, E e F – H&F, A.T. x100, 600µm.

Figura 14 – Fotomicrografias representativas do lado da pata recoberta por pele espessa de camundongos Swiss infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com ácido ascórbico e/ou licarina A.

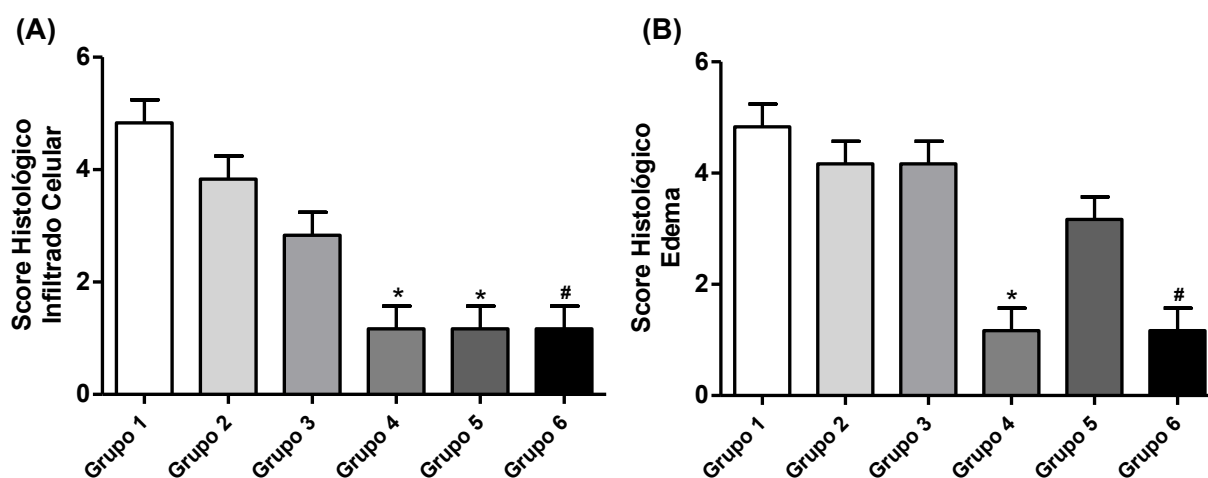


Fonte: Elaboração própria. Camundongos Swiss foram pré-tratados com ácido ascórbico durante 15 dias, sendo em seguida infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados ácido ascórbico e/ou licarina A por via oral. Ao fim do tratamento, os animais foram eutanasiados e as patas dos grupos experimentais: Grupo 1 (A), Grupo 2 (B), Grupo 3 (C), Grupo 4 (D), Grupo 5 (E) e Grupo 6 (F) foram coletadas e analisadas. Edema (seta vermelha), infiltrado leucocitário (seta preta) e fibras colágenas (seta verde). Fotomicrografias A, B, C, D, E e F – H&F, A.T. x100, 600µm.

Os resultados de análise histológica também foram plotados em dois gráficos correspondentes ao infiltrado celular e edema presente nas patas desses animais após tratamento com ácido ascórbico e/ou licarina A (Gráfico 19).

Analisando o score histológico do infiltrado celular (Gráfico 19A) observa-se que os grupos que receberam a neolignana licarina A, Grupos 4 e 5, apresentaram um nível de infiltrado semelhante ao controle sadio que não foi infectado com *Leishmania* (Grupo 6), indicando um controle da neolignana neste parâmetro. Verificando o tamanho do edema, observa-se que os animais do grupo 4, que receberam a licarina A + ácido ascórbico, tiveram seus edemas reduzidos quando comparados ao controle, resultando em um perfil qualitativo semelhante aos animais sadios (Gráfico 19B).

Gráfico 19 – Efeito do tratamento da Licarina A e/ou Ácido ascórbico no infiltrado celular e edema da pata de camundongos *Swiss* infectados com *L. (L.) amazonensis*.



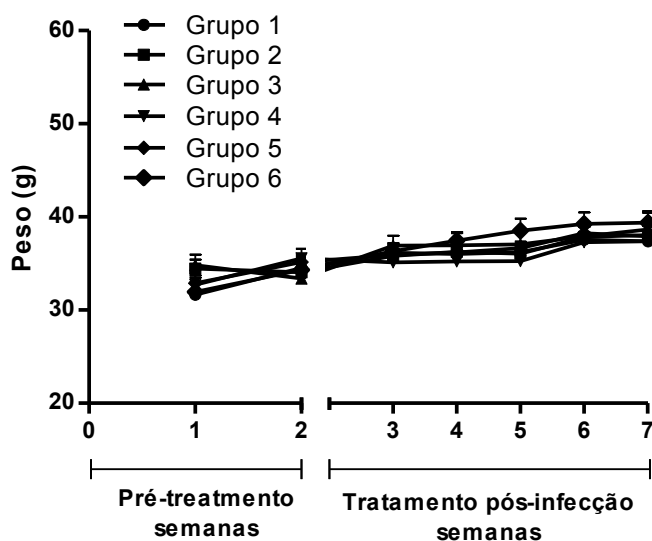
Fonte: Elaboração própria. Score do infiltrado celular (A) e do Edema (B) presente na pata dos animais. Score do Infiltrado celular: 1 – ausência de infiltrado celular; 2 – grau leve: menos de 25% de aumento de infiltrado celular; 3 – grau moderado: de 25 a 49% de aumento de infiltrado celular; 4 – grau acentuado: de 50 a 75% de aumento de infiltrado celular; 5 – grau muito acentuado: mais de 75% de aumento de infiltrado celular. Score do Edema: 1 – ausência de alterações histológicas; 2 – grau leve: aumento de menos de 25%; 3 – grau moderado: aumento de 25 a 49%; 4 – grau acentuado: aumento de 50 a 75%; 5 – grau muito acentuado: aumento de mais de 75%. Foi realizado *One-way ANOVA* seguido pelo teste *Kruskal-Wallis* para comparação entre os grupos, sendo * $p \leq 0,05$ em comparação com o Grupo 1 – controle; e # $p \leq 0,05$ comparação do Grupo 6 com o Grupo 1.

Com isso, confirmamos a atividade biológica da associação ácido ascórbico + licarina A sobre o edema de pata causado pela infecção com *L. (L.) amazonensis*, assim como verificamos que esse co-tratamento induziu uma redução no infiltrado inflamatório, semelhante ao observado por Castro e colaboradores (2014) no fígado de animais infectados com *L. (L.) infantum* e tratados com Sb^{III} lipossomal + ácido ascórbico. Um efeito hepatoprotetor da vitamina C também foi observado quando associada com o agente antineoplásico cantaridina, reduzindo o infiltrado de células inflamatórias, da massa necrótica assim como reestabelecimento da histoarquitetura desse órgão quando comparados aos animais que receberam apenas a cantaridina (WU et al., 2015). No presente trabalho, o co-tratamento do ácido ascórbico + licarina A induziu o restabelecimento da histoarquitetura do principal local de infecção (pata) dos animais infectados quando comparados ao controle, demonstrando a potencialidade dessa associação.

4.5.3. Análise de parâmetros relacionados à toxicidade do tratamento com a licarina A associada ao ácido ascórbico sobre camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis*

Durante todo período de experimentação foram realizadas análises de parâmetros que poderiam indicar toxicidade dos tratamentos, pela avaliação semanal do peso corporal e queda de pelo dos camundongos. Não foi observada diferença de peso dos animais nos grupos avaliados (Gráfico 20), nem queda de pelo ou aspecto debilitado que indicasse alguma toxicidade. Contudo, como já havíamos observado um indício de toxicidade para a licarina A (100 mg/kg/dia) em estudos prévios (NÉRIS, 2012), decidiu-se fazer um estudo toxicológico mais aprofundado, avaliando os parâmetros bioquímicos e hematológicos desses animais.

Gráfico 20 – Peso dos camundongos Swiss infectados com *L. (L.) amazonensis* durante o tratamento com a licarina A e/ou ácido ascórbico



Fonte: Elaboração própria. Camundongos Swiss foram pré-tratados com veículo (Grupo 1) ou ácido ascórbico (Grupos 2-5) durante 15 dias, sendo em seguida infectados com *L. (L.) amazonensis*. Após infecção os animais foram tratados com o veículo (Grupo 1 e 2), Ácido ascórbico (Grupo 3), ácido ascórbico + licarina A (Grupo 4) e apenas com licarina A (Grupo 5) por via oral. Grupo 6 corresponde a animais não infectados (controle sadio). Durante todo experimento os animais foram avaliados semanalmente quanto ao peso corporal. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média de cada grupo.

A investigação toxicológica dos animais por meio da avaliação de parâmetros bioquímicos e hematológicos do sangue periférico dos animais estão expostos nas tabelas 4 e 5.

A análise dos parâmetros bioquímicos revelou que não houve alteração na atividade das enzimas hepáticas aspartato aminotransferases (AST) e alanina aminotransferase (ALT) entre os animais que receberam diferentes tipos de tratamentos (ácido ascórbico, licarina A ou ácido ascórbico associado a licarina A) (Tabela 4). Em relação a função renal, também não verificou-se alterações nos níveis de creatinina entre os animais do Grupo 1, controle que recebeu apenas veículo, com os animais que receberam os diferentes protocolos de tratamento (Tabela 4). Os animais que receberam tratamento com o ácido ascórbico + licarina A (Grupo 4) não apresentaram alterações na concentração sérica de ureia quando comparadas ao Grupo 1. Contudo, os animais do Grupo 3 (tratados apenas com ácido ascórbico) apresentaram níveis mais elevados de ureia (44,36

$\pm 2,86$ mg/dL) quando comparados ao Grupo 1 ($33,43 \pm 1,53$ mg/dL), assim como os animais do Grupo 5 ($47,01 \pm 2,11$ mg/dL) que foram tratados apenas com a licarina A (Tabela 4). Quando o controle sadio (não infectado) foi analisado, observou-se que as concentrações séricas de ureia desses animais também estavam mais elevadas quando comparadas ao Grupo 1 e Grupo 2 (Tabela 4).

Tabela 4 – Parâmetros bioquímicos de sangue periférico de camundongos *Swiss* infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com a Licarina A e/ou Ácido ascórbico.

Grupos	AST, U/L	ALT, U/L	Ureia, mg/dL	Creatinina, mg/dL
Grupo 1	$185,8 \pm 8,75$	$39,50 \pm 4,01$	$33,43 \pm 1,53$	$0,31 \pm 0,02$
Grupo 2	$186,6 \pm 21,88$	$41,88 \pm 7,09$	$38,05 \pm 1,71^d$	$0,31 \pm 0,03$
Grupo 3	$164,4 \pm 8,04$	$50,57 \pm 8,50$	$44,36 \pm 2,86^a$	$0,36 \pm 0,02$
Grupo 4	$161,0 \pm 13,28$	$45,33 \pm 7,08$	$43,37 \pm 3,31$	$0,32 \pm 0,01$
Grupo 5	$163,6 \pm 13,70$	$38,86 \pm 4,04$	$47,01 \pm 2,11^b$	$0,34 \pm 0,01$
Grupo 6	$135,9 \pm 13,12$	$26,57 \pm 3,36$	$48,71 \pm 2,04^c$	$0,34 \pm 0,03$

Fonte: Elaboração própria. Os valores representam a média $\pm$ erro padrão da média de oito animais analisados. Foi realizado o *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos, sendo ^a $p < 0,05$; ^b $p < 0,01$; ^c $p < 0,001$ comparado ao grupo 1. ^d $p < 0,05$ comparado ao Grupo 6 (animais sadios não infectados).

Com relação aos parâmetros hematológicos não foram observadas alterações dos seguintes parâmetros: contagem total de hemácias, concentração de hemoglobina, hematócrito, Volume Corpuscular Médio (VCM), Hemoglobina Corpuscular Média (HCM), Concentração Hemoglobínica Corpuscular Média (CHCM) e contagem total e diferencial de leucócitos (segmentados, monócitos e eosinófilos).

Tabela 5 – Parâmetros hematológicos de sangue periférico de camundongos Swiss infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com a Licarina A e/ou Ácido ascórbico.

Parâmetros	Controle	Grupo 2	Grupo 3	Grupo 4	Grupo 5	Grupo 6
Hemácias ($10^6/\text{mm}^3$)	9,44 ± 0,30	9,51 ± 0,19	10,19 ± 1,36	10,65 ± 1,380	10,98 ± 1,09	10,24 ± 0,37
Hemoglobina (g/dL)	14,91 ± 0,60	15,13 ± 0,31	14,64 ± 0,36	15,32 ± 1,03	14,09 ± 0,3	14,08 ± 0,22
Hematócrito (%)	49,51 ± 1,75	50,35 ± 1,16	47,66 ± 0,8	52,05 ± 4,34	45,03 ± 1,66	48,45 ± 1,74
VCM (fm^3)	52,45 ± 0,65	52,96 ± 0,48	53,96 ± 0,42	52,72 ± 0,72	53,19 ± 0,77	53,66 ± 0,43
HCM (pg)	15,80 ± 0,33	15,93 ± 0,16	16,58 ± 0,3	15,58 ± 0,24	16,83 ± 0,38	15,68 ± 0,47
CHCM (g/dL)	30,08 ± 0,39	30,05 ± 0,32	30,70 ± 0,49	29,60 ± 0,4	31,63 ± 0,7	29,59 ± 0,8
Leucócitos totais ($10^3/\text{mm}^3$)	9,4 ± 0,76	10,96 ± 0,99	10,19 ± 1,36	10,65 ± 1,38	10,98 ± 1,09	10,24 ± 0,37
Linfócitos	85,50 ± 1,44	84,00 ± 1,66	84,13 ± 1,51	83,17 ± 1,05	83,75 ± 1,92	88,38 ± 1,72
Segmentados	12,25 ± 1,35	14,50 ± 1,25	14,25 ± 1,05	15,67 ± 0,84	15,38 ± 1,64	10,88 ± 1,79
Monócitos	2,25 ± 0,56	1,25 ± 0,37	1,62 ± 0,6	1,00 ± 0,68	0,75 ± 0,41	0,62 ± 0,26
Eosinófilos	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,0 ± 0,0	0,16 ± 0,16	0,12 ± 0,12	0,12 ± 0,12

Fonte: Elaboração própria. Os valores representam a média ± erro padrão da média de oito animais analisados. Foi realizado *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparação entre os grupos.

A atividade *in vivo* de drogas associadas ao ácido ascórbico já vem sendo observada em diversos estudos, especialmente em pesquisas que visam diminuir a toxicidade desses fármacos (SHARMA; SEHGAL; KAUR, 2012; KATO et al., 2014; CASTRO et al., 2014; WU et al., 2015; CHEN et al., 2015). Dentre os sinais de toxicidade sistêmica podemos destacar a redução da massa corporal dos animais experimentais, devido a redução no consumo de água e ração, assim como alterações comportamentais, apatia, queda de pelo e alterações no peso dos órgãos, nos parâmetros bioquímicos e hematológicos (CUNHA et al., 2009).

O fígado é o órgão de detoxificação dos mamíferos e os rins o principal órgão excretor, sendo ambos susceptíveis a ação de drogas. Dentre os marcadores das funções hepáticas podemos destacara alteração das enzimas citoplasmáticas aspartato aminotransferases (AST) e alanina aminotransferase (ALT), que são liberadas após dano irreversível dos hepatócitos (HENRY, 2008).

Os níveis semelhantes dessas enzimas nos grupos experimentais observados no presente trabalho indicam que os tratamentos não induzem hepatotoxicidade.

Alteração da função renal também é uma das consequências relacionadas à toxicidade medicamentosa, principalmente devido a excreção inadequada dos medicamentos ou de seus metabólitos (HENRY, 2008). A avaliação da função renal pode ser feita através da determinação das concentrações dos compostos nitrogenados não protéicos ureia e creatinina, visto que quando ocorre falha renal a eliminação desses compostos pelos rins é comprometida, com consequente acúmulo e aumento dos seus níveis no sangue (PFALLER; GSTRAUNTHALER, 1998; HENRY, 2008).

Os protocolos de tratamento recebidos pelos grupos 2 e 4 podem estar associadas a uma alteração na função renal, visto que os níveis de ureia estão elevados em comparação ao grupo 1 (controle). Contudo, uma vez que os níveis de ureia dos animais dos grupos 2 e 4 são semelhantes ao controle sadio, uma redução momentânea na ingestão de alimentos pelos grupos 1 e 2 poderia ter ocasionado os níveis mais baixos desse produto, visto que a ingestão reduzida de proteínas pode levar a valores plasmáticos reduzidos de ureia (SILVA et al., 2005). Os níveis não alterados de creatinina observados indicam que esta hipótese poderia estar acontecendo, ao invés de um efeito nefrotóxico, contudo, uma melhor investigação deve ser realizada para o esclarecimento desse efeito.

A análise dos parâmetros hematológicos, através da quantificação dos elementos celulares do sangue, também nos permite observar indícios de toxicidade de determinada droga visto que o sistema hematopoiético é extremamente sensível à substâncias com potencial mutagênico ou citotóxico (LIMA; SOARES; GRECO, 2002). O tratamento de animais infectados com *L. (L.) amazonensis* com ácido ascórbico e/ou licarina A não exerceu efeito tóxico no sangue dos animais, considerando que nenhuma alteração significativa nos parâmetros hematológicos foi evidenciada.

4.5.4. Análise da resposta imunomoduladora

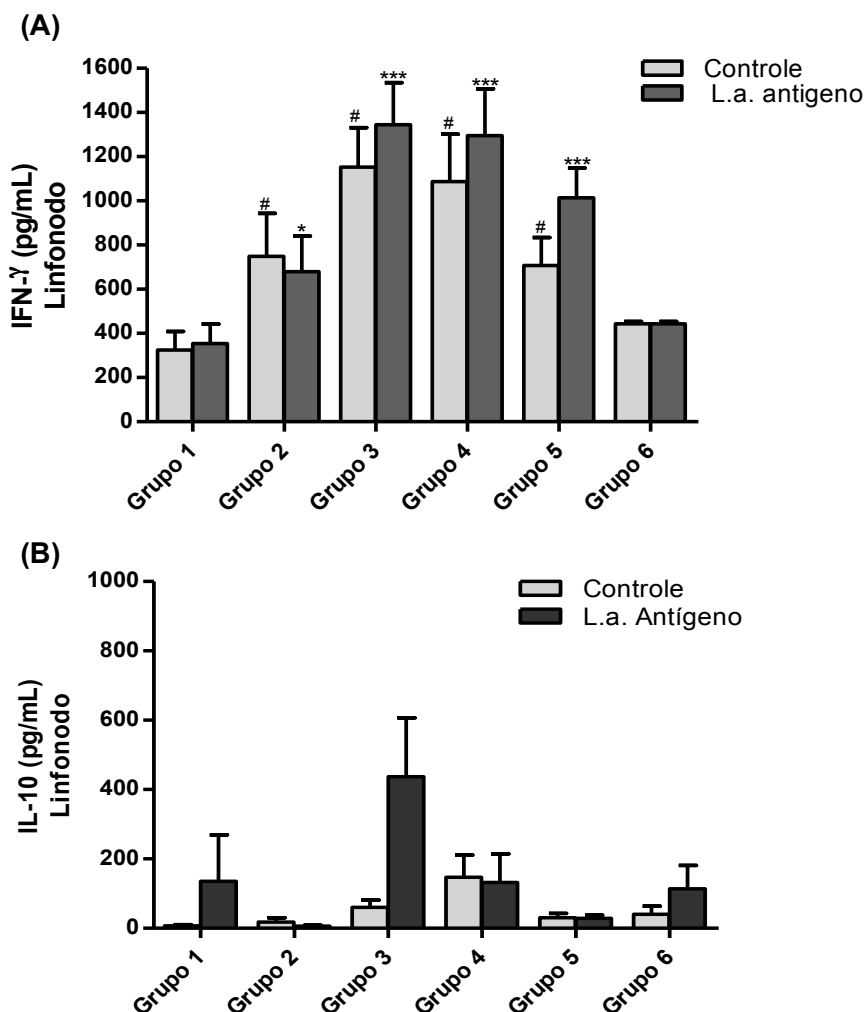
Para avaliar se a atividade antileishmania observada *in vivo* após o tratamento da licarina A + ácido ascórbico seria resultado de uma possível ação imunomoduladora dessas substâncias, visto que essa neolignana foi capaz de modular a síntese de algumas citocinas de macrófagos infectados, a produção das citocinas IFN- γ e IL-10 foram analisadas no sobrenadante da suspensão de células do linfonodo poplíteo dos diferentes grupos experimentais (Gráfico 21).

Com relação aos níveis de IFN- γ , observou-se que todos os grupos que receberam pré-tratamento com o ácido ascórbico apresentaram níveis mais elevados dessa citocina quando comparados ao grupo 1, que não teve administração dessa vitamina (Gráfico 21A). De forma interessante, os grupos que continuaram a receber o ácido ascórbico após infecção, Grupos 3 e 4, apresentaram níveis ainda mais elevados dessa citocina (Gráfico 21A). Quando os animais foram tratados apenas com a vitamina (Grupo 3), este aumento foi de cerca de 250 e 280% para as culturas não estimuladas e estimuladas com antígeno de *L. (L.) amazonensis* (Gráfico 21A). Para o grupo tratado com ácido ascórbico + licarina A (Grupo 4), este aumento foi de 235 e 266,7% para as culturas não estimuladas e estimuladas com antígeno quando comparamos ao grupo 1 (controle) (Gráfico 21A). A produção da citocina IL-10 também foi avaliada, contudo, nenhuma mudança foi observada na produção desta citocina frente ao tratamento realizado (Gráfico 21B).

A citocina IFN- γ é uma das principais moléculas pró-inflamatórias envolvidas na imunoproteção na leishmaniose cutânea, sendo produzida principalmente por células NK, linfócitos Th1 CD4+ e citotóxicos CD8+ (GANTT et al., 2001; AWASTHI et al., 2004; MASPI et al., 2016). Esta citocina possui papel essencial no controle da *Leishmania*, uma vez que atua sobre os macrófagos estimulando sua atividade microbicida através da produção de NO e EROS, o que induz a morte do parasita intracelular (BOGDAN et al., 2000; SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002; VILA-DEL SOL et al., 2007; TRIPATHI et al., 2007; MASPI et al., 2016). Além disso, o IFN- γ promove a diferenciação de células T CD4+ no subtipo

Th1, perfil relacionado a resistência às leishmanioses, e inibe o desenvolvimento do perfil susceptível Th2 (MASPI et al., 2016).

Gráfico 21 – Níveis das citocinas IFN- γ e IL-10 produzidas pelas células do linfonodo poplíteo de camundongos *Swiss* infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados com ácido ascórbico e/ou licarina A.



Fonte: Elaboração própria. Camundongos *Swiss* foram pré-tratados com veículo (Grupo 1) ou ácido ascórbico (Grupos 2-5) durante 15 dias, sendo em seguida infectados com *L. (L.) amazonensis*. Após infecção os animais foram tratados com o veículo (Grupo 1 e 2), Ácido ascórbico (Grupo 3), Ácido ascórbico + Licarina A (Grupo 4) e com Licarina A (Grupo 5) por via oral. Grupo 6 corresponde a animais saudáveis não infectados. Após o fim do tratamento, os animais foram eutanasiados e o linfonodo poplíteo direito coletado, macerado e a suspensão de células cultivadas na ausência ou presença do antígeno de *L. (L.) amazonensis* por 72h em estufa a 37°C e 5% de CO₂. Os níveis das citocinas IFN- γ (A) e IL-10 (B) foram mensurados no sobrenadante da cultura pela técnica de ELISA (Kit Biociência®). Foi realizado teste *t-student*, sendo $*p \leq 0,05$; e $***p \leq 0,001$ em comparação ao controle (grupo 1) estimulado por antígeno; $^{\#}p \leq 0,05$ em comparação ao controle (grupo 1) não estimulado por antígeno.

Muitos trabalhos vêm demonstrando o papel do IFN- γ no controle da infecção causada por *Leishmania* em modelo de infecção experimental (LIEW et al., 1990; PINHEIRO; ROSSI-BERGMANN, 2007). Nieto-Yañez e colaboradores (2017) avaliaram a atividade do extrato metanólico de *Bursera aptera* em camundongos BALB/c infectados com *L. (L.) mexicana* e verificaram uma diminuição no tamanho da lesão e em sua carga parasitária após tratamento tópico, sendo correlacionados a altos níveis de IFN- γ e TNF- α . Gamboa-Léon e colaboradores (2007) investigando a atividade antileishmania do extrato de *Allium sativum* em modelo experimental de leishmaniose cutânea com *L. (L.) mexicana* verificaram diminuição na lesão dos animais, a qual correlacionaram com o aumento de IFN- γ . No ano de 2016, Sghaier e colaboradores observaram que derivados sintéticos de ésteres de tirosil induziram uma diminuição no tamanho de lesão de animais infectados com *L. (L.) major*, sendo este efeito correlacionado com a síntese de IFN- γ . Dessa forma, semelhante ao observado na literatura, a atividade antileishmania *in vivo* da associação ácido ascórbico + licarina A está correlacionada à produção de IFN- γ .

Dessa forma, verificou-se que em modelo experimental *in vivo*, camundongos infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados via oral com licarina A associada ao ácido ascórbico apresentaram menores lesões no local de inoculação, menor carga parasitária no baço e linfonodo e restauração parcial da histoarquitetura da pata infectada. Esse resultado *in vivo* foi associado a uma resposta imunomoduladora, através de uma maior produção de IFN- γ por células dos linfonodos dos animais. Adicionalmente, esse tratamento não apresentou toxicidade significativa, visto que os animais co-tratados com a licarina A e ácido ascórbico não apresentaram alteração de peso, pelagem, nem nos parâmetros bioquímicos e hematológicos avaliados.

5 CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

Esse trabalho permitiu concluir que a licarina A apresenta uma significativa atividade antipromastigota e antiamastigota, assim como propriedades imunomoduladoras em modelos de infecção *in vitro* e *in vivo* com *L. (L.) amazonensis*. Esta neolignana também demonstrou eficácia sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. (L.) amazonensis* resistentes ao antimonial trivalente, parasitas estes que apresentaram uma maior virulência e diferente perfil de metilação de DNA quando comparados ao seu par sensível. O tratamento *in vivo* da licarina A associada ao ácido ascórbico resultou em menores lesões, menor carga parasitária no baço e linfonodo e restauração parcial da histoarquitetura da pata de camundongos *Swiss* infectados com *L. (L.) amazonensis*. Esses resultados estão associados a uma resposta imunomoduladora, devido a um aumento na produção de IFN- γ . Dessa forma, a licarina A apresenta-se como uma molécula promissora a ser melhor investigada na busca por novos tratamentos para as leishmanioses.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ABE, F.; NAGAFUJI, S.; YAMAUCHI, T.; OKABE, H.; MAKI, J.; HIGO, H.; AKAHANE, H.; AGUILAR, A.; JIMÉNEZ-ESTRADA, M.; REYES-CHILPA, R. Trypanocidal Constituents in Plants 1. Evaluation of Some Mexican Plants for Their Trypanocidal Activity and Active Constituents in Guaco, Roots of *Aristolochia taliscana*. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 25: n. 9, p. 1188-1191, 2002.

ABREU-SILVA, A.L.; CALABRESE, K.S.; CUPOLILO, S.M.N.; CARDOSO, F.O.; SOUZA, C.S.F.; GONÇALVES DA COSTA, S.C. Histopathological studies of visceralized *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in mice experimentally infected. **Veterinary Parasitology**. v.121, p.179–187, 2004.

AGA, E.; KATSCHINSKI, D. M.; VAN ZANDBERGEN, G.; LAUFS, H.; HANSEN, B.; MÜELLER, K.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. **The Journal of Immunology**. v. 169, n. 2, p. 898-905, 2002.

AHUA, K. M.; IOSET, J. R.; IOSET, K. N.; DIALLO, D.; MAUËL, J.; HOSTETTMANN, K. Antileishmanial activities associated with plants used in the Malian traditional medicine. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 110, n.1, p. 99-104, 2006.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSEL, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**. v. 112, n.18, p. 2993-3002, 1999.

ALI, I.K.M.; EHRENKAUFER, G. M.; HACKNEY, J. A.; SINGH, U. Growth of the protozoan parasite *Entamoeba histolytica* in 5-azacytidine has limited effects on parasite gene expression. **BMC Genomics**. v.8, n.7, p. 1-19, 2007

ALVAR, J.; VELEZ, I. D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J.; JANNIN, J.; BOER, M. D. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE**. v. 7, n. 5, e35671. 2012.

AMORIM, F. M.; RODRIGUES, Y. K. S.; BARBOSA, T. P.; NÉRIS, P. L.; CALDAS, J. P.; SOUSA, S. C.; LEITE, J. A.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; VASCONCELOS, M. S.; OLIVEIRA, M. R. Morita-Baylis-Hillman adduct shows in vitro activity against *Leishmania (Viannia) braziliensis* associated with a reduction in IL-6 and IL-10 but independent of nitric oxide. **Parasitology**, v.140, p. 29-38, 2012.

ANDERSON, C.F.; MENDEZ, S.; SACKS, D. L. Nonhealing infection despite Th1 polarization produced by a strain of *Leishmania major* in C57BL/6 mice. **Journal of Immunology**. v.174, n. 5, p. 2934–41, 2005.

ANDRADE, B. B.; de OLIVEIRA, C. I.; BRODSKYN, C. I.; BARRAL, A.; BARRAL-NETTO, M. Role of Sand Fly Saliva in Human and Experimental Leishmaniasis: Current Insights. **Scandinavian Journal of Immunology**. v. 66, n. 2-3, p. 122–127, 2007.

ANSARI, N. A.; SALUJA, S.; SALOTRA, P. Elevated levels of interferon- γ , interleukin-10, and interleukin-6 during active disease in Indian kala azar. **Clinical Immunology**. v. 119, p. 339–345, 2006.

ASSCHE, T. V.; DESCHACHT, M.; LUZ, R. A. I. L.; MAES, L.; COS, P. *Leishmania*–macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology & Medicine**. v. 51, p. 337–351, 2011.

AVENIENTE, M.; PINTO, E. F.; SANTOS, L. S.; ROSSI-BERGMANN, B.; BARATA, L.E.S. Structure–activity relationship of antileishmanials neolignan analogues. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 15, p. 7337–7343, 2007.

AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian Journal of Medical Research**. v. 119, p. 238-258, 2004.

BARATA L. E. ; SANTOS, L. S. ; FERRI, P. H. ; PHILLIPSON, J. D. ; PAINE, A. ; CROFT, S. L. Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. **Phytochemistry**. v.55, n.6 p. 589 – 595, 2000.

BARBOSA-FILHO, J. M.; YOSHIDA, M.; GOTTLIEB, O. R. Lignoids from *Nectandra amazonum* and *N. glabrescens*. **Phytochemistry**. v. 28, n. 7, p. 1991-1992, 1989.

BARBOSA-FILHO, J. M. Lignanas, neolignanas e seus análogos. In: Oliveira Simões, Cláudia Maria et. al.. **Farmacognosia da planta ao medicamento**. 5ª ed. rev. ampl., primeira reimpressão. Porto Alegre/Florianópolis: Editora da UFRGS / Editora da UFSC, 2004. 1102p. 557-575, 2004.

BARRAL-NETTO, M.; VON SOHSTEN, R. L.; TEIXEIRA, M.; CONRADO DOS SANTOS, W. L.; POMPEU, M. L.; MOREIRA, R. A.; OLIVEIRA, J. T. A.; CAVADA, B. S.; FALCOFF, E.; BARRAL, A. *In vivo* protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on Balb/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. **Acta Tropica**. v. 60, p. 237-250, 1996.

BARROS, L. F. L.; BARISON, A.; SALVADOR, M. J.; MELO-SILVA, R.; CABRAL, E. C. Constituents of the Leaves of *Magnolia ovata*. **Journal of Natural Products**. v. 72, p. 1529–1532, 2009.

BHATTACHARYA, P.; MONDAL, S.; BASAK, S.; DAS, P.; SAHA, A.; BERA, T. In Vitro susceptibilities of wild and drug resistant *Leishmania donovani* amastigotes to piperolactam A loaded hydroxypropyl- β -cyclodextrin nanoparticles. **Acta Tropica**. v.158, p. 97–106, 2016.

BAUD, V.; KARIN, M. Signal transduction by tumor necrosis factor and its relatives. **TRENDS in Cell Biology**. v.11, n.9, p. 372-377, 2001.

BELKAID, Y.; HOFFMANN, K. F.; MENDEZ, S.; KAMHAWI, S.; UDEY, M. C.; WYNN, T. A.; SACKS, D. L. The role of interleukin (IL)-10 in the persistence of *Leishmania major* in the skin after healing and the therapeutic potential of anti-IL-10 receptor antibody for sterile cure. **Journal of Experimental Medicine**, v. 194, p. 1497-1506, 2001.

BHANDARI, V.; SUNDAR, S.; DUJARDIN, J. C.; SALOTRA, P. Elucidation of cellular mechanisms involved in experimental paromomycin resistance in *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.58, n. 5, p. 2580-2585, 2014.

BOGDAN, C.; GESSENER, A.; SOLBACH, W.; RÖLLINGHOFF, M. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. **Current Opinion in Immunology**. v. 8, n. 4, p. 517-525, 1996.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A. Reactive oxygen and reactive nitrogen intermediates in innate and specific immunity. **Current Opinion in Immunology**. v. 12, p. 64-76, 2000.

BRAGA, F. G.; BOUZADA, M. L. M.; FABRI, R. L.; MATOS, M. O.; MOREIRA, F. O.; SCIO, E.; COIMBRA, E. S. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 111, n. 2, p. 396-402, 2007.

BRASIL. Ministério da saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. 1a ed., 3a reimpressão. Brasília, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2a ed., 180p. Brasília, 2007.

BRASIL, SINAN/SVS/MS. Dados Epidemiológicos Sinan. **Casos confirmados notificados no sistema de informação de agravos de notificação – Paraíba**. 2015. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinanet/cnv/ltapb.def>>. Acesso em: 05 Set 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. **Casos de Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2016a. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/07/LT-Casos.pdf>> Acesso em: 05 Set 2017

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Sistema de Informação de Agravos de Notificação. **Casos confirmados de Leishmaniose Visceral**. 2016b. Disponível em: <<http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2016/novembro/08/LV-Casos.pdf>> Acesso em: 05 Set 2017

BRESOLIN, T.M.B.; FILHO, V.C., **Ciências Farmacêuticas: Contribuição ao desenvolvimento de novos fármacos e medicamentos**. Editora: UNIVALI-SC, p. 11-18, 2003.

CABANILLAS, B. J.; LAMER, A.C.L.; CASTILLO, D.; AREVALO, J.; ROJAS, R.; ODONNE, G. BOURDY, G.; MOUKARZEL, B.; SAUVAIN, M.; FABRE, N. Caffeic Acid Esters and Lignans from *Piper sanguineispicum*. **Journal of Natural Products**. v., 73, p. 1884–1890, 2010

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

CALDAS, J.P.A. **Investigação da Atividade Antileishmania e Citotóxica das Neolignanas Burchelina, Grandisina e Licarina A**. 2010, 106p. Dissertação de Mestrado (Mestrado Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Farmacologia e Química) – Laboratório de Tecnologia Farmacêutica, Universidade Federal da Paraíba.

CARTER, K.C.; HUTCHISON, S.; BOITELLE, A.; MURRAY, H.W.; SUNDAR, S.; MULLEN, A.B. Sodium stibogluconate resistance in **Leishmania donovani** correlates with greater tolerance to macrophage antileishmanial responses and trivalent antimony therapy. **Parasitology**. v. 131, p.747–757, 2005.

CARVALHO, P. B.; FERREIRA, E. I. Leishmaniasis phytotherapy. Nature's leadership against an ancient disease. **Fitoterapia** v. 72, p. 599-618, 2001.

CASTELLANO, L.R.; ARGIRO, L.; DESSEIN, H.; DESSEIN, A.; SILVA, M.V.; CORREIA, D.; RODRIGUES, V. Potential use of interleukin-10 blockade as a therapeutic strategy in human cutaneous Leishmaniasis. **Journal of Immunology Research**. v. 2015, p. 1-5, 2015.

CASTRO, R.A.; SILVA-BARCELLOS, N.M.; LICIO, C.S.A.; SOUZA, J.B.; SOUZA-TESTASICCA, M.C.; FERREIRA, F.M.; BATISTA, M.A.; SILVEIRA-LEMOS, D.; MOURA, S.L.; FREZARD, F.; REZENDE, S.A. Association of Liposome-Encapsulated Trivalent Antimonial with Ascorbic Acid: An Effective and Safe Strategy in the Treatment of Experimental Visceral Leishmaniasis. **PLoS ONE**. v.9, n.8, p. e104055, 2014.

CHEN, Q.; POLIREDDY, K.; CHEN, P.; DONG, R. An unpaved journey of vitamin C in cancer treatment. **Journal of Physiology and Pharmacology**. V.93, p. 1-9, 2015.

CHIOCCARA, F.; POLI, S.; RINDONE, B.; PILATI, T.; BRUNOW, G.; PIETIKAINEN, P.; SETAËLAË, H. Regio- and diastereo-selective Synthesis of Dimeric Lignans using Oxidative Coupling. **Acta Chemica Scandinava**. v. 47, p. 610-616, 1993.

CONVIT, J.; ULRICH, M. Antigen-specific immunodeficiency and its relation to the spectrum of American cutaneous leishmaniasis. **Biological Research**. v. 26, n. 1-2, p. 159-166, 1993.

CORTAZAR, T. M.; COOMBS, G. H.; WALKER, J. *Leishmania panamensis*: comparative inhibition of nuclear DNA topoisomerase II enzymes from promastigotes and human macrophages reveals antiparasite selectivity of fluoroquinolones, flavonoids and pentamidine. **Experimental Parasitology**., v. 116, n. 4, p. 475-482, 2007.

COSTA, M. C. A. **Relações entre a estrutura química de neolignanas e a sua atividade antileishmaniose, envolvendo cálculos de solvatação**. 1998 183p. Tese de Doutorado (Doutorado em Físico-química) – Instituto de Química – Universidade Estadual de Campinas, Campinas, SP.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**. v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.

CUNHA, L. C.; AZEREDO, F. S.; MENDONÇA, A. C. V.; VIEIRA, M. S.; PUCCI, L. L.; VALADARES, M. C.; FREITAS, H. O. G.; SENA, A. A. S.; LINO JUNIOR, R. S. Avaliação da toxicidade aguda e subaguda, em ratos, do extrato etanólico das folhas e do látex de *Synadenium umbellatum* Pax. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 19, n. 2, p.403-411, 2009

CUPOLILO, S. M.; SOUZA, C. S.; ABREU-SILVA, A. L.; CALABRESE, K. S.; COSTA, S. C. G. Biological behavior of *Leishmania (L.) amazonensis* isolated from a human diffuse cutaneous leishmaniasis in inbred strains of mice. **Histology and Histopathology**, v. 18, p. 1059-1065, 2003.

DA CRUZ, A. M.; OLIVEIRA, M. P.; DE LUCA, P. M.; MENDONÇA, S. C. F.; COUTINHO, S. G.; Tumour Necrosis Factor- α in human american tegumentary leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 91, p. 225-229, 1996.

DA SILVA, I. A.; MORATO, C. I.; QUIXABEIRA, V. B. L.; PEREIRA, L. I. A.; DORTA, M. L.; OLIVEIRA, M. A. P.; HORTA, M. F.; RIBEIRO-DIAS, F. In vitro metacyclogenesis of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Clinical Field Isolates, as Evaluated by Morphology, Complement Resistance, and Infectivity to Human Macrophages. **BioMed Research International**. v. 2015, 2015.

DAVID, C. V.; CRAFT, N. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Dermatologic Therapy**. v. 22, p. 491-502, 2009.

DE MUYLDER, G.; ANG, K.K.H.; CHEN, S.; ARKIN, M.R.; ENGEL, J.C.; MCKERROW, J.H. A Screen against *Leishmania* Intracellular Amastigotes: Comparison to a Promastigote Screen and Identification of a Host Cell-Specific Hit. **PLoS Neglected Tropical Disease**. v. 5, n. 7, p. e1253, 2011.

DEL RIO, M.; RUEDAS, G.; MEDINA, S.; VICTOR, V.; DE LA FUENTE, M. Improvement by several antioxidants of macrophage function in vitro. **Life Sciences**. v. 63, n. 10, p. 871-881, 1998.

DEY, S.; PAPADOPOULOU, B.; HAIMER, A.; ROY, G.; GRONDIN, K.; DOU, D.; ROSEN, B.P.; OUELLETTE, M.. High level arsenite resistance in *Leishmania tarentolae* is mediated by an active extrusion system. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v.67, p. 49 –57, 1994.

DIEHL, S.; RINCÓN, M. The two faces of IL-6 on Th1/Th2 differentiation. **Molecular Immunology**. v. 39, p. 531–536, 2002.

DUQUE, G.A.; DESCOTEAUX, A. *Leishmania* survival in the macrophage: where the ends justify the means. **Current Opinion in Microbiology**, v.26, p.32–40, 2015.

DUTTA, A.; SARKAR, D.; GURIB-FAKIM, A.; MANDAL, C.; CHATTERJEE, M. *In vitro* and *in vivo* activity of *Aloe vera* leaf exudate in experimental visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**. v. 102, n. 6, p. 1235-1242, 2008.

EHRCHEN, J. M.; ROTH, J.; ROEBROCK, K.; VARGA, G.; DOMSCHKE, W.; NEWBERRY, R.; SORG, C.; MULLER-TIDOW, C.; SUNDERKÖTTER, C.; KUCHARZIK, T.; SPAHN, T. W. The absence of cutaneous lymph nodes results in a Th2 response and increased susceptibility to *Leishmania major* infection in mice. **Infection and Immunity**. v. 76, n. 9, p. 4241-4250, 2008.

FARIAS, N. D.; OLIVEIRA, N. F. P.; SILVA, P. M. *Perkinsus* infection is associated with alterations in the level of global DNA methylation of gills and gastrointestinal tract of the oyster *Crassostrea gasar*. **Journal of Invertebrate Pathology**. v.149, p. 76–81, 2017.

FEASEY, N.; WANSBROUGH-JONES, M.; MABEY, D. C. W.; SOLOMON, A. W. Neglected tropical diseases. **British Medical Bulletin**. v. 93, p. 179-200, 2010.

FÉLIX, M. B.; DE SOUZA, E. R.; DE LIMA, M. DO C. A.; FRADE, D. K. G.; SERAFIM, V. L.; RODRIGUES, K. A. F.; NÉRIS, P. L. N.; RIBEIRO, F. F.; SCOTTI, L.; SCOTTI, M. T.; AQUINO, T. M.; MENDONÇA JUNIOR, F. J.; OLIVEIRA, M. R. Antileishmanial activity of new thiophene–indole hybrids: design, synthesis, biological and cytotoxic evaluation, and chemometric studies. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 24, p. 3972–3977, 2016.

FERREIRA, C.S.; MARTINS, P.S.; DEMICHELI, C.; BROCHU, C.; OUELLETTE, M.; FREZARD, F. Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione. **Biomaterials**. v.16, n.3, p. 441–446, 2003

FIGUEIREDO, L.M.; CROSS, G.A.M.; JANZEN, C.J. Epigenetic regulation in African trypanosomes: a new kid on the block. **Nature Reviews Microbiology**. v.7, n.7, p. 504–513, 2009.

FISHER, O. SIMAN-TOV, R.; ANKRI, S. Characterization of cytosine methylated regions and 5-cytosine DNA methyltransferase (Ehmeth) in the protozoan parasite *Entamoeba histolytica*. **Nucleic Acids Research**. v.32, n.1, p.287-97, 2004

FISHER, O. SIMAN-TOV, R.; ANKRI, S. Pleiotropic phenotype in *Entamoeba histolytica* overexpressing DNA methyltransferase (Ehmeth). **Molecular and Biochemical Parasitology**. v.147, n.1, p. 48-54, 2006.

FRADE, D. K. G. **O impacto da resistência ao antimônio trivalente na biologia e resistência à lise pelo complemento em *Leishmania (Leishmania) amazonensis***. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2016, 82p.

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

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C.; RIBEIRO, R. R. Pentavalent antimonials: new perspectives for old drugs. **Molecules**, v. 14, p. 2317-2336, 2009.

FRÉZARD, F.; MONTE-NETO, R.; REIS, P. Antimony transport mechanisms in resistant *Leishmania* parasites. **Biophysical Reviews**, v. 6, n. 1, p. 119-132, 2014.

GAMBOA-LÉON, M.R.; ARANDA-GONZALEZ, I.; MUT-MARTIN, M.; GARCIA-MISS, M.R.; DUMONTEIL, E. *In vivo* And *In vitro* Control of *Leishmania Mexicana* due to Garlic-induced NO Production. **Scandinavian Journal of Immunology**. v. 66, p. 508–514, 2007.

GARCÍA-HERNANDEZ, R.; GOMES-PEREZ, V.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. Fitness of *Leishmania donovani* Parasites Resistant to Drug Combinations. **PLoS Neglected Tropical Disease**. v. 9, n.4, p. e0003704, 2015

GANTT, K. R.; GOLDMAN, T. L.; MCCORMICK, M. L.; MILLER, M. A.; JERONIMO, S. M. B.; NASCIMENTO, E. T.; BRITIGAN, B. E.; WILSON, M. E. Oxidative Responses of Human and Murine Macrophages During Phagocytosis of *Leishmania chagasi*. **The Journal of Immunology**. v.167, p. 893-901, 2001.

GARG, R.; SINGH, N.; DUBE, A. Intake of nutrient supplements affects multiplication of *Leishmania donovani* in hamsters. **Parasitology**. v.129, p. 685–691, 2004.

GAVERY, M.R.; ROBERTS, S.B. Predominant intragenic methylation is associated with gene expression characteristics in a bivalve mollusc. **PeerJ**. v.1, e215, doi: 10.7717/peerj.215. 2013.

GEKELER, V.; ISE, W.; SANDERS, K. H. et al. The leukotriene LTD4 receptor antagonist MK571 specifically modulates MRP associated multidrug resistance. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. v.1, p. 345-52, 1995.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**. v. 7, n. 3, p. 338-349, 2004.

GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **International Journal for Parasitology**. v. 33, n. 10, p. 1027–1034, 2003.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**. v. 26, p. 293–307, 2012.

GOURBAL, B.; SONUC, N.; BHATTACHARJEE, H.; LEGARE, D.; SUNDAR, S.; OUELLETTE, M.; ROSEN, B. P.; MUKHOPADHYAY. Drug Uptake and Modulation of Drug Resistance in *Leishmania* by an Aquaglyceroporin. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 279, n. 30, p. 31010–31017, 2004.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite and [15N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**. v. 126, n. 1, p. 131-138, 1982.

GUIMARÃES, E. T.; SANTOS, L. A.; RIBEIRO DOS SANTOS, R.; TEIXEIRA, M. M.; DOS SANTOS, W. L.; SOARES, M. B. Role of interleukin-4 and prostaglandin E2 in *Leishmania amazonensis* infection of BALB/c mice. **Microbes and infection**, v. 8, p. 1219-1226, 2006.

GUIMARÃES, T.T.; PINTO, M.C.F.R.; LANZA, J.S.; MELO, M.N.; MONTE-NETO, R.L.; MELO, I.M.M.; DIOGO, E.B.T.; FERREIRA, V.F.; CAMARA, C.A.; VALENÇA, W.O.; OLIVEIRA, R.N.; FREZARD, F.; SILVA JUNIOR, E.N. Potent naphthoquinones against antimony-sensitive and -resistant *Leishmania* parasites: Synthesis of novel α - and nor- α -lapachone- based 1,2,3-triazoles by copper-catalyzed azidealkyne cycloaddition. **European Journal of Medicinal Chemistry**. v.63, p. 523e530. 2013

GUPTA, S.; YARDLEY, V.; VISHWAKARMA, P.; SHIVAHARE, R.; SHARMA, B.; LAUNAY, D.; MARTIN, D.; PURI, S. K. Nitroimidazo-oxazole compound DNDI-VL-2098: an orally effective preclinical drug candidate for the treatment of visceral leishmaniasis. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 70, p. 518-527, 2014.

HALDAR, A.K.; YADAV, V.; SINGHAL, E.; BISHT, K.K.; SINGH, A.; BHAUMIK, S.; BASU, R.; SEN, P.; ROY, S. Leishmania donovani Isolates with Antimony-Resistant but Not -Sensitive Phenotype Inhibit Sodium Antimony Gluconate-Induced Dendritic Cell Activation. **PLOS Pathogens**. v.6, n5, p. e1000907, 2010.

HALDAR, A.K.; SEN, P.; ROY, S. Use of Antimony in the Treatment of Leishmaniasis: Current Status and Future Directions. **Molecular Biology International**. doi:10.4061/2011/571242. p. 1-23, 2011

HATZIGEORGIOU, D. E.; HE, S.; SOBEL, J.; GRABSTEIN, K. H.; HAFNER, A.; HO, J. L. IL-6 down-modulates the cytokine-enhanced antileishmanial activity in human macrophages. **The Journal of Immunology**. v. 151, n. 7, p. 3682-92, 1993.

HEINRICH, P.; BEHRMANN, I.; HAAN, S.; HERMANN, H. M.; ULLER-NEUEN, G.; SCHAPER, F. Principles of interleukin (IL)-6-type cytokine signalling and its regulation. **Biochemical Journal**. v. 374, p. 1–20, 2003.

HEINZEL, F. P.; SCHOENHAUT, D. S.; RERKO, R. M.; ROSSER, L. E.; GATELY, M.K. Recombinant interleukin 12 cures mice infected with *Leishmania major*. **The Journal of Experimental Medicine**. v.177, n. 5, p.1505–09, 1993.

HEMILA, H. Vitamin C and Infections. **Nutrients**. v. 9, n. 339, p. 1-28, 2017.

HENDRICKSON, N.; SIFRI, C.D.; HENDERSON, D.M.; ALLEN, T.; WIRTH, D.F. Molecular characterization of the *Idmdr1* multidrug resistance gene from *Leishmania donovani*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v.60, p. 53-64, 1993.

HENDRICKX, S.; LEEMANS, A.; MONDELAERS, A.; RIJAL, S.; KHANAL, B.; DUJARDIN, J.; DELPUTTE, P.; COS, P.; MAES, L. Comparative fitness of a parent *Leishmania donovani* clinical isolate and its experimentally derived paromomycin-resistant strain. **PloS One**. v. 10, n. 10, pp. 1-15, 2015.

HENDRICKX, S.; BEYERS, J.; MONDELAERS, A.; EBERHARDT, E.; LACHAUD, L.; DELPUTTE, P.; COS, P.; MAES, L. Evidence of a drug-specific impact of experimentally selected paromomycin and miltefosine resistance on parasite fitness in *Leishmania infantum*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. v. 71, n. 7, pp. 1914-21, 2016

HENRY, J. B. **Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais**. 20. Manole. ISBN 8520415113, 2008.

HOLZMULLER, P.; SERENO, D.; LEMESRE, J-L. Lower nitric oxide susceptibility of trivalent antimony-resistant amastigotes of *Leishmania infantum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 49, n. 10, pp. 4406-09, 2005.

HOTEZ, P. J.; MOLYNEUX, D. H.; FENWICK, A.; KUMARESAN, J.; SACHS, S. E.; SACHS, J. D.; SAVIOLI, L. Control of Neglected Tropical Diseases. **The New England Journal of Medicine**. v. 357, n.10, p. 1018-1027, 2007.

IQBAL, K.; KHAN, A.; KHATTAK, M. A. K. Biological Significance of Ascorbic Acid (Vitamin C) in Human Health –A Review. **Pakistan Journal of Nutrition**, v.3, p. 5-13, 2004.

JHA, T. K.; SHYAM, S.; THAKUR, C. P.; BACHMANN, P.; KARBWANG, J.; FISCHER, C.; VOSS, A.; BERMAN, J. Miltefosine, an oral agent for treatment of Indian visceral leishmaniasis. **The New England Journal of Medicine**. v. 341, n. 24, p. 1795-1800, 1999.

JHINGRAN, A.; CHAWLA, B.; SAXENA, S.; BARRET, M. P.; MADHUBALA, R., Paromomycin: uptake and resistance in *Leishmania donovani*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. v. 164, n. 2, p.111-117. 2009.

JI, J.; SUN, J.; SOONG, L. Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity**, v. 71, p. 4278-4288, 2003.

JONES, D. E.; BUXBAUM, L. U.; SCOTT, P. IL-4-independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection. **Journal of immunology**, v. 165, p. 364-72, 2000.

KAMHAWI, S. Phlebotominae sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? **Trends in Parasitology**. v. 22, p. 439-445, 2006.

KAR, N.; CHAKRABORTY, S.; KUMAR DE, A.; GHOSH, S.; BERA, T. Development and evaluation of a cedrol-loaded nanostructured lipid carrier system for *in vitro* and *in vivo* susceptibilities of wild and drug resistant *Leishmania donovani* amastigotes. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. doi: 10.1016/j.ejps.2017.03.046. 2017.

KATO, K.C.; MORAIS-TEIXEIRA, E.; REIS, P.G.; SILVA-BARCELLOS, N.; SALAUN, P.; CAMPOS, P.P.; CORREA-JUNIOR, J.D.; RABELLO, A.; DEMICHELI, C.; FREZARD, F. Hepatotoxicity of Pentavalent Antimonial Drug: Possible Role of Residual Sb(III) and Protective Effect of Ascorbic Acid. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 58, n. 1, p. 481–488, 2014.

KILLICK-KENDRICK, R. The Biology and Control of Phlebotomine Sand Flies. **Clinics in Dermatology**. v.17, n. 3, p. 279–289, 1999.

KLOEHN, J.; SAUNDERS, E.C.; O'CALLAGHAN, S.; DAGLEY, M.J.; MCCONVILLE, M.J. Characterization of metabolically quiescent *Leishmania* parasites in murine lesions using heavy water labeling. **PLoS Pathogens**. v.11, n.2, p.e1004683, 2015.

KOCYIGIT, A.; GUR, S.; GUREL, M. S.; BULUT, V.; ULUKANLIGIL, M. Antimonial Therapy Induces Circulating Proinflammatory Cytokines in Patients with Cutaneous Leishmaniasis. **Infection and Immunity**. v. 70, n. 12. p. 6589–6591, 2002.

LAUFS, H.; MÜLLER, K.; FLEISCHER, J.; REILING, N.; JAHNKE, N.; JENSENIUS, J. C.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Intracellular survival of *Leishmania major* in neutrophil granulocytes after uptake in the absence of heat-labile serum factors. **Infection and Immunity**, v. 70, n. 2, p. 826–835, 2002.

LEE, N.; BERTHOLET, S.; DEBRABANT, A.; MULLER, J. DUNCAN, R.; NAKHASI, H. L. Programmed cell death in unicellular protozoan parasite *Leishmania*. **Cell Death and Differentiation**. v.9, p.53-64, 2002.

LEE, J. S.; KIM, J.; YU, Y. U.; KIM, Y. C. Inhibition of Phospholipase Cy1 and Cancer Cell Proliferation by Lignans and Flavans from *Machilus thunbergii*. **Archives of Pharmacal Research**. v. 27, n. 10, p. 1043-1047, 2004.

LEE, S.U.; SHIM, K.S.; RYU, S.Y., MIN, Y.K., KIM, S.H. Machilin A Isolated from *Myristica fragrans* stimulates osteoblast differentiation. **Planta Medica**. v. 75, p. 152–157, 2009.

LÉGARÉ, D.; CAYER, S.; SINGH, A. K.; RICHARD, D.; PAPADOPOULOU, B.; OUELLETTE, M. ABC Proteins of *Leishmania*. **Journal of Bioenergetics and Biomembranes**, v. 33, n. 6, p 469-474, 2001.

LEÓN-DÍAZ, R.; MECKES, M.; SAID-FERNÁNDEZ, S.; MOLINA-SALINAS, G. M.; VARGAS-VILLARREAL, J; TORRES, J.; LUNA-HERRERA, J.; JIMÉNEZ-ARELLANES, A. Antimycobacterial neolignans isolated from *Aristolochia taliscana*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 105, n. 1, p. 45-51, 2010

LI, F.; YANG, X. Simultaneous Determination of Diastereomers (+)-Licarin A and Isolicanin A from *Myristica fragrans* in Rat Plasma by HPLC and its Application to their Pharmacokinetics. **Planta Medica**. v. 74, p. 880–884, 2008a.

LI, F.; YANG, X. Determination of dehydrodiisoeugenol in rat tissues using HPLC method. **Biomedical Chromatography**. v. 22, p. 1206–1212, 2008b.

LI, F.; YANG, X. Metabolism of the Lignan Dehydrodiisoeugenol in Rats. **Planta Medica**. v. 77, p. 1712–1717, 2011.

LI, F.; YANG, X. Analysis of anti-inflammatory dehydrodiisoeugenol and metabolites excreted in rat feces and urine using HPLC-UV. **BIOMEDICAL CHROMATOGRAPHY**. v. 26, n. 6, p. 703-707, 2012

LIARTE, D. B.; MURTA, S. M. Selection and phenotype characterization of potassium antimony tartrate-resistant populations of four New World *Leishmania* species. **Parasitology Research**, v. 107, p. 205-12, 2010.

LIEW, F.; WEI, F. Y.; PROUDFOOT, L. Cytokines and nitric oxide as ejector molecules against parasitic infections. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**. v. 352, p. 1311-1315, 1997.

LIEW, F. Y.; LI, Y.; MILLOT, S. Tumour necrosis factor (TNF- α) in leishmaniasis. II. TNF- α -induced macrophage leishmanicidal activity is mediated by nitric oxide from L-arginine. **Immunology**. v. 71, n. 4, p. 556-559, 1990.

LIMA, A.O; SOARES, J.B.; GRECO, J. **Métodos de Laboratório Aplicados à Clínica**. 8. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 126-129, 2002.

LINDOSO, J. A. L.; LINDOSO, A. A. B. P. Neglected Tropical Diseases in Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**. v. 51, n. 5, p. 247-253, 2009

LINDOSO, J. A.; COSTA, J. M.; QUEIROZ, I. T.; GOTO, H. Review of the current treatments for leishmaniasis. **Research and Reports in Tropical Medicine**, v. 3, 69-77, 2012.

LOENEN, W.A.M. S-Adenosylmethionine: jack of all trades and master of everything?. **Biochemical Society Transactions**. v. 34, n. 2, p. 330-333, 2006

LONGCHAR, A.; PRASAD, S.B. Biochemical changes associated with ascorbic acid–cisplatin combination therapeutic efficacy and protective effect on cisplatin-induced toxicity in tumor-bearing mice. **Toxicology Reports**. v.2, p. 489–503, 2015.

MA, C. J.; KIM, S. R.; KIM, J.; KIM, Y. C. Meso-dihydroguaiaretic acid and licaric acid of *Machilus thunbergii* protect against glutamate-induced toxicity in primary cultures of a rat cortical cells. **British Journal of Pharmacology**. v. 146, p. 752-759, 2005.

MAAROUF, M.; de KOUCHKOVSKY, Y.; BROWN, S.; PETIT, P. X.; ROBERT-GERO, M., In vivo interference of paromomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*. **Experimental Cell Research**. v. 232, n.2, p. 339-348. 1997.

MAIA-ELKHOURY, A. N. S.; ALVES, W. A.; SOUSA-GOMES, M. L.; SENA, J. M.; LUNA, E. A.; Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges. **Caderno de Saúde Pública**, v. 24, n. 12, p. 2941-2947, 2008.

MAIOLI, T.U.; TAKANE, E.; ARANTES, R.M.E.; FIETTO, J.L.R.; AFONSO, L.C.C. Immune response induced by New World *Leishmania* species in C57BL/6 mice. **Parasitology Research**. v. 94, p. 207–212, 2004.

MALHERBE, L.; FILIPPI, C.; JULIA, V.; FOUCRAS, G.; MORO, M.; APPEL, H.; WUCHERPFENNIG, K. Selective activation and expansion of high-affinity CD4⁺ T cells in resistant mice upon infection with *Leishmania major*. **Immunity**. v. 13, p. 771–782, 2000.

MANDAL, G.; SARKAR, A.; SAHA, P.; SINGH, N.; SUNDAR, S.; CHATTERJEE, M. Functionality of drug efflux pumps in antimonial resistant *Leishmania donovani* field isolates. **Indian Journal of Biochemistry & Biophysics**. v.46, p. 86-92, 2009.

MANZANO, J.I.; GARCIA-HERNANDEZ, R.; CASTANYS, S.; GAMARRO, F. A new ABC half-transporter in *Leishmania* is involved in resistance to antimony. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 57, n.8, p.3719–3730, 2013.

MARR, A.K.; MACLASAAC, J.L.; JIANG, R.; AIRO, A.M.; KOBOR, M.S.; MCMASTER, W.R. *Leishmania donovani* infection causes distinct epigenetic DNA methylation changes in host macrophages. **PLoS Pathogens**. v.10, p. e1004419. 2014.

MARQUIS, N.; GOURBAL, B.; ROSEN, B.P.; MUKHOPADHYAY, R.; OUELLETTE, M. Modulation in aquaglyceroporin AQP1 gene transcript levels in drug-resistant *Leishmania*. **Molecular Microbiology**. v. 57, n.6, p.1690–1699, 2005

MARTINEZ-CALVILLO, S.; VIZUET-DE-RUEDA, J.; FLORENCIO-MARTINEZ, L.E.; MANNING-CELA, R.G.; FIGUEROA-ANGULO, E.E. Gene Expression in Trypanosomatid Parasites. **Journal of Biomedicine and Biotechnology**. v.2010, p. 1-15, doi:10.1155/2010/525241. 2010

MASPI, N.; ABDOLI, A.; GHAFARIFAR, F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathogens and Global Health**. v.110, n. 6, p. 247-260, 2016.

MAY, J.M.; QU, Z.C. Transport and intracellular accumulation of vitamin C in endothelial cells: relevance to collagen synthesis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 434, p. 178–186, 2005a.

MAY, J.M.; LI, L.; QU, Z.; HUANG, J. Ascorbate uptake and antioxidant function in peritoneal macrophages. **Archives of Biochemistry and Biophysics**. v. 440, n.2, p. 165-172, 2005b.

MCMASTER, R.; MORRISON, C.J.; KOBOR, M.S. Epigenetics: A New Model for Intracellular Parasite–Host Cell Regulation. **Trends in Parasitology**. <http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2016.04.002>. 2016

MEHTA, A; SHAHA, C. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition. **The Journal of Biological Chemistry**. v.279, n.12, 2004.

MESSARITAKIS, I.; CHRISTODOULOU, V.; MAZERIS, A.; KOUTALA, E.; VLAHOU, A.; PAPADOGIORGAKI, S.; ANTONIOU, M. Drug Resistance in Natural Isolates of *Leishmania donovani* s.l. Promastigotes Is Dependent of Pgp170 Expression. **PLoS ONE**. v.8, n.6, p. e65467. 2013.

MICHALICK, M. S. M.; MARQUES, M. J.; REIS, A. B.; DIAS, M.; COSTA, C. A.; GENARO, O.; SILVA, A. L. F. F.; MAYRINK, W. Gênero *Leishmania*. In: NEVES, D. P.; MELO, A. L.; GENARO, O.; LINARDI, P. M. **Parasitologia Humana** 10ª Ed. Editora Ateneu, São Paulo, 2000. p.31-35.

MIERT, S.V.; DYCK, S.V.; SCHIMIDT, T.; BRUN, R.; VLIETINCK, A.; LEMIÈRE, G.; PIETERS, L. Antileishmanial activity, cytotoxicity and QSAR analysis of synthetic dihydrobenzofuran lignans and related benzofurans. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**. v. 13, p. 661–669, 2005.

MIZUTANI, A.; MAKI, H.; TORII, Y.; HITOMI, K.; TSUKAGOSHI, N. Ascorbate-dependent enhancement of nitric oxide formation in activated macrophages. **Nitric Oxide**. v. 2, n. 4, p. 235-241, 1998.

MOHAPATRA, S. Drug resistance in leishmaniasis: Newer developments. **Tropical Parasitology**. v.4, n.1, p. 4-9, 2014

MONDAL, S.; ROY, P.; DAS, S.; HALDER, A.; MUKHERJEE, A.; BERA, T. In Vitro Susceptibilities of Wild and Drug Resistant *Leishmania donovani* Amastigote Stages to Andrographolide Nanoparticle: Role of Vitamin E Derivative TPGS for Nanoparticle Efficacy. **PLoS ONE** v.8, n.12, p. e81492, 2013.

MONTE-NETO, R.L., SOUZA, L.M.A., DIAS, C.S., BARBOSA-FILHO, J.M., OLIVEIRA, M.R. Yangambin Cytotoxicity: a pharmacologically active lignan obtained from *ocotea duckei* vattimo (Lauraceae). **Zeitschrift für Naturforschung. C, Journal of biosciences**. v. 63, p.681–686, 2008.

MONTE-NETO, R. L.; COELHO, A. C.; RAYMOND, F.; LÉGARÉ, D.; CORBEIL, J.; MELO, M. N.; FRÉZARD, F.; OUELLETTE, M. Gene expression profiling and molecular characterization of antimony resistance in *Leishmania amazonensis*. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 5, e1167, 2011.

MONTE-NETO, R. L.; LAFFITTE, M.C.N; LEPROHON, P.; REIS, P.; FREZARD, F.; OUELLETTE, M. Intrachromosomal Amplification, Locus Deletion and Point Mutation in the Aquaglyceroporin AQP1 Gene in Antimony Resistant *Leishmania (Viannia) guyanensis*. **PLoS Neglected Tropical Disease**. v.9 n.2, p. e0003476, 2015

MONTEIRO, M. C.; LIMA, H. C.; SOUZA, A. A. A.; TITUS, R. G.; ROMÃO, P. R. T; CUNHA, F. Q. Effect Of *Lutzomyia longipalpis* Salivary Gland Extracts On Leukocyte Migration Induced By *Leishmania major*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 76, n. 1, p. 88–94, 2007.

MOREIRA, D. S.; SANTARÉM, N.; LOUREIRO, I.; TAVARES, J.; SILVA, A. M. Impact of Continuous Axenic Cultivation in *Leishmania infantum* Virulence. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 1, e1469, 2012.

MOREIRA, D.S.; MONTE NETO, R.L.; ANDRADE, J.M.; SANTI, A.M.M.; REIS, P.G.; FREZARD, F.; MURTA, S.M.F. Molecular characterization of the MRPA transporter and antimony uptake in four New World *Leishmania* spp. susceptible and resistant to antimony. **International Journal for Parasitology: Drugs and Drug Resistance**. v.3, p.143–153, 2013.

MOSKOWITZ, N. H.; BROWN, D. R.; REINER, S. L. Efficient Immunity against *Leishmania major* in the absence of Interleukin-6. **Infection and Immunity**. v. 65, n. 6, p. 2448-2450, 1997.

MOUGNEAU, F.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell Biology and Immunology of *Leishmania*. **Immunological Reviews**. v. 240, p. 286–296, 2011

MOURA, T. R.; SANTOS, M. L.; BRAZ, J. M.; SANTOS, L. F.; ARAGÃO, M. T.; OLIVEIRA, F. A.; SANTOS, P. L.; SILVA, A. M.; JESUS, A. R.; ALMEIDA, R. P. Cross- resistance of *Leishmania infantum* isolates to nitric oxide from patients refractory to antimony treatment, and greater tolerance to antileishmanial responses by macrophages. **Parasitology Research**. v. 115, n. 2, pp. 713-21, 2016.

MUKBEL, R. M.; PATTEN-JR, C.; GIBSON, K.; GHOSH, M.; PETERSEN, C.; JONES, D. E. Macrophage Killing Of *Leishmania Amazonensis* Amastigotes Requires Both Nitric Oxide And Superoxide. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v. 76, n. 4, p. 669-675, 2007.

MUKHERJEE, A.; PADMANABHAN, P. K.; SINGH, S.; ROY, G.; GIRARD, I.; CHATTERJEE, M.; OUELLETTE, M.; MADHUBALA, R. Role of ABC transporter MRPA, γ -glutamylcysteine synthetase and ornithine decarboxylase in natural antimony-resistant isolates of *Leishmania donovani*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 59, p. 204- 211, 2007.

MUKHERJEE, A.; BOISVERT, S.; MONTE-NETO, R.L.; COELHO, A. C.; RAYMOND, F.; MUKHOPADHYAY, R.; CORBELL, J.; OUELLETTE. Telomeric gene deletion and intrachromosomal amplification in antimony-resistant *Leishmania*. **Molecular Microbiology**. v. 88, n.1, p.189–202, 2013.

MUKHOPADHYAY, R.; MUKHERJEE, S.; MUKHERJEE, B.; NASKAR, K.; MONDAL, D.; DECUUPERE, S.; OSTYN, B.; PRAJAPATI, V. K.; SUNDAR, S.; DUJARDIN, J. C.; ROY, S. Characterisation of antimony-resistant *Leishmania donovani* isolates: biochemical and biophysical studies and interaction with host cells. **International Journal for Parasitology**. v.41, n.13-14, p.1311-21, 2011.

MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I.; PAULA-COELHO, V. N. Meglumine antimoniate directly increases phagocytosis, superoxide anion and TNF- α production, but only via TNF- α it directly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, *in vitro*. **International Immunopharmacology**. v. 8, n. 12, p. 1633-1638, 2008.

MURRAY, H. W.; NATHAN, C. F. Macrophage microbicidal mechanisms in vivo: reactive nitrogen versus oxygen intermediates in the killing of intracellular visceral *Leishmania donovani*. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 189, n. 4, p. 741-746, 1999.

MURRAY, H. W.; BERMAN, J. D.; DAVIES, C. R.; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**. v. 366, p. 1561 – 1577, 2005.

MURRAY, H. W. Accelerated Control of Visceral *Leishmania donovani* Infection in Interleukin-6-Deficient Mice. **Infection and Immunity**. v. 76, n. 9, p. 4088–4091, 2008.

NASCIMENTO, I. R.; LOPES, L. M. X.; DAVIN, L. B.; LEWIS, N. G. Stereoselective Synthesis of 8,9-Licarinediols. **Tetrahedron**. v. 56, p. 9181-9193, 2000.

NÉRIS, P. L. N. **NEOLIGNANA LICARINA A: SÍNTESE E INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA SOBRE *Leishmania* sp.** 2012. Dissertação (Mestrado no Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos – Farmacologia. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa-PB).

NÉRIS, P. L. N.; CALDAS, J. P. A.; RODRIGUES, Y. K. S.; AMORIM, F. M.; LEITE, J. A.; RODRIGUES-MASCARENHAS, S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; RODRIGUES, L. C.; OLIVEIRA, M. R. Neolignan Licarin A presents effect against *Leishmania (Leishmania) major* associated with immunomodulation *in vitro*. **Experimental Parasitology**, v. 135, p. 307-313, 2013.

NIETO-YAÑEZ, O.J.; RESENDIZ-ALBOR, A.A.; RUIZ-HURTADO, P.A.; RIVERA-YANEZ, N.; RODRIGUES-CANALES, M.; RODRIGUEZ-SOSA, M.; JUAREZ-AVELAR, I.; RODRIGUEZ-LOPEZ, M.; CANALES-MARTINEZ, M.M.; RODRIGUEZ-MONROY, M.A. In vivo and in vitro antileishmanial effects os methanolic extract from bark of *Busera aptera*. **African Journal of Traditional Complementary and Alternative Medicine**. v.14, n.2, p.188-197, 2017.

NIEVES, E.; PIMENTA P. F. Development of *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Leishmania) amazonensis* in the sand fly *Lutzomyia migonei* (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**. v. 37, n. 1, p. 134-140, 2000.

OLIVEIRA, M. R.; TAFURI, W. L.; AFONSO, L. C. C.; OLIVEIRA, M. A. P.; NICOLI, J. R.; VIEIRA, E. C.; SCOTT, P.; MELO, M. N.; VIEIRA, L. Q. Germ-free mice produce high levels of interferon-gamma in response to infection with

Leishmania major but fail to heal lesions. **Parasitology**. v. 131, n. 5, p. 477-488, 2005.

OLIVIER, M.; ATAYDE, V. D.; ISNARD, A.; HASSANI, K.; SHIO, M. T. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. **Microbes and Infection**. v. 14, pp. 1377- 89, 2012.

OUAKAD, M.; VANAERSCHOT, M.; RIJAL, S.; SUNDAR, S.; SPEYBROECK, N.; KESTENS, L.; BOEL, L.; DONCKER, D.; MAES, I.; DECUYPERE, S.; DUJARDIN, J. C. Increased metacyclogenesis of antimony-resistant *Leishmania donovani* clinical lines. **Parasitology**. v. 138, n. 11, pp. 1392-99, 2011.

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resistance Update**. v. 7, n. 4-5, p.257-266, 2004.

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

PADIGEL, U.; ALEXANDER, J., FARREL, J.P. The role of interleukin-10 in susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. **Journal of Immunology**, v. 171, 3705-3710, 2003.

PARIS, C.; LOISEAU, P. M.; BORIES, C.; BRÉARD, J. Miltefosine induces apoptosis like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.48, n.3, p.852-859, 2004.

PARK, B.Y.; MIN, B.S.; KWON, O.K.; OH, S.R.; AHN, K.S; KIM, T.J.; KIM, D.Y.; BAE, K.; LEE, H.K. Increase in caspase-3 activity by lignans from *Machilus thunbergii* in HL-60 cells. **Biological & Pharmaceutical Bulletin**. v. 27, n. 8, p. 1305-1307, 2004.

PATHAK, M. K.; YI, T. Sodium Stibogluconate Is a Potent Inhibitor of Protein Tyrosine Phosphatases and Augments Cytokine Responses in Hemopoietic Cell Lines. **The Journal of Immunology**, v.167, p.3391-3397, 2001.

PEREIRA, B. A. S.; ALVES, C. R. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 158, p. 239-255, 2008.

PEREIRA, A. C.; MAGALHÃES, L. G.; GONÇALVES, U. O.; LUZ, , P. P. ; MORAES, A.C.G; RODRIGUES, V.; DA MATTA GUEDES, P. M.; DA SILVA FILHO, A. A.; CUNHA, W. R.; BASTOS, J. K.; NANAYAKKARA, N. P. D.; SILVA, M. L. A. Schistosomicidal and trypanocidal structure–activity relationships for (±)-licarin A and its (-)- and (+)-enantiomers. **Phytochemistry**. v. 72, p. 1424–1430, 2011.

PERUHYPE-MAGALHÃES, V.; MARTINS-FILHO, O. A.; PRATA, A.; SILVA, L. A.; RABELLO, A.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; FIGUEIREDO, R. M.; GUIMARÃES-CARVALHO, S. F.; FERRARI, T. C. A.; VAN WEYENBERGH, J.; CORREA-OLIVEIRA, R. Mixed inflammatory/regulatory cytokine profile marked by simultaneous raise of interferon- γ and interleukin-10 and low frequency of tumour necrosis factor- α ⁺ monocytes are hallmarks of active human visceral Leishmaniasis due to *Leishmania chagasi* infection. **Clinical and Experimental Immunology**. v. 146, p. 124–132, 2006.

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

PFALLER, W.; GSTRAUNTHALER, G. Nephrotoxicity testing in vitro – what we know and what we need to know. **Environment Health Perspectives**. v. 106, p. 559-568, 1998.

PIGOTT, D. M.; BHATT, S.; GOLDING, N.; DUDA, K. A.; BATTLE, K. E.; BRADY, O. J.; MESSINA, J. P.; BALARD, Y.; BASTIEN, P.; PRATLONG, F.; BROWNSTEIN, J. S.; FREIFELD, C. C.; MEKARU, S. R.; GETHING, P. W.; GEORGE, D. B.; MYERS, M. F.; REITHINGER, R.; HAY, S. I. Global distribution maps of the leishmaniasis. **eLife**, v. 3, p. 1-7, 2014.

PINHEIRO, R.O.; ROSSI-BERGMANN. Interferon-gamma is required for the late but not early control of *Leishmania amazonensis* infection in C57Bl/6 mice. **Memorial Instituto Oswaldo Cruz**. v.102, p.79–82. 2007.

PONGER, L.; LI, W.H. Evolutionary Diversification of DNA Methyltransferases in Eukaryotic Genomes. **Molecular Biology and Evolution**. v. 22, n. 4, p. 1119-1128, 2005.

PONTS, N.; FU, L.; HARRIS, E.Y.; ZHANG, J.; CHUNG, D.W.D.; CERVANTES, M.C.; PRUDHOMME, J.; ATANASOVA-PENICHON, V.; ZEHRAOUI, E.; BUNNIK, E.; RODRIGUES, E.M.; LONARDI, S.; HICKS, G.R.; WANG, Y.; ROCH, K.G.L. Genome-wide mapping of DNA methylation in the human malaria parasite *Plasmodium falciparum*. **Cell Host Microbe**. v. 14, n.6, p. 696–706, 2013.

PRUKAIT, B.; KUMRA, A.; NANDI, N.; SARDAR, A. H.; DAS, S.; KUMAR, S.; PANDEY, K.; RAVIDAS, V.; KUMAR, M.; DE, T.; SINGH, D.; DAS, P., Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents Chemotherapy**. v. 56, n.2, p.1031-1041, 2012.

RAI, S.; BHASKAR, G.S.K.; NATH DWIVEDI, U.; SUNDAR, S.; GOYAL, N. Role of efflux pumps and intracellular thiols in natural antimony resistant isolates of *Leishmania donovani*. **PLoS ONE**. v. 8, n.9, p.e74862, 2013.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; de JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C. Antimoniais empregados no tratamento das leishmanioses: estado da arte. **Química Nova**. v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

RAVICHANDRAN, K. S.; LORENZ, U. Engulfment of apoptotic cells: signals for a good meal. **Nature Review Immunology**. v. 7, p. 964–974, 2007.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J. C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**. v. 7, n. 9, p. 581–96, 2007.

RINCÓN, M.; ANGUITA, J.; NAKAMURA, T.; FIKRIG, E.; FLAVELL, R. A. Interleukin (IL)-6 Directs the Differentiation of IL-4-producing CD4⁺ T Cells. **The Journal of Experimental Medicine**. v.185, n. 3, p. 461–469, 1997.

RIVIERE, G. Epigenetic features in the oyster *Crassostrea gigas* suggestive of functionally relevant promoter DNA methylation in invertebrates. **Frontiers in Physiology**. v.5, p.1–8, 2014.

ROCHA, L. G.; ALMEIDA, J. R.; MACEDO, R. O.; BARBOSA-FILHO, J. M. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**. v. 12, p. 514-535, 2005.

RODRIGUES, K. A. F.; DIAS, C. N. DE S.; NÉRIS, P. L. DO N.; ROCHA, J. C.; SCOTTI, M. T.; SCOTTI, L.; MASCARENHAS, S. R.; VERAS, R. C.; DE MEDEIROS, I. A. KEESEN, T. S. L.; DE OLIVEIRA, T. B.; DE LIMA, M. C.; BALLIANO, T. L.; DE AQUINO, T. M. DE MOURA, R. O.; MENDONÇA JUNIOR, F. J. B.; DE OLIVEIRA, M. R. 2-Amino-thiophene derivatives present antileishmanial activity mediated by apoptosis and immunomodulation *in vitro*. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 106, p. 1-14, 2015.

RODRIGUES, K. A. F. **DERIVADOS 2-AMINO-TIOFÊNICOS: INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA SOBRE *Leishmania (Leishmania) amazonensis***. 2017. 193f. **Tese** – Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos (CCS/UFPB), João Pessoa – PB.

ROGERS, K. A.; DEKREY, G. K.; MBOW, M. L.; GILLESPIE, R. D.; BRODSKYN, C. I.; TITUS, R. G. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. **FEMS Microbiology Letters**. v.209, n. 1, p. 1-7, 2002.

RUSSELL, D. G.; TALAMAS-ROHANA, P. *Leishmania* and the macrophage: a marriage of inconvenience. **Immunology Today**, v. 10, p. 328-333, 1989.

SACKS, D. L.; MODI, G.; ROWTON, E.; SPATH, G.; EPSTEIN, L.; TURCO, S. J.; BEVERLEY, S. M. The role of phosphoglycans in *Leishmania*- sand fly interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**. v. 97, n. 1, pp. 406–11, 2000.

SACKS, D. L. Leishmania-sand fly interactions controlling species-specific vector competence. **Cellular Microbiology**. v. 3, n. 4, pp. 189–96, 2001.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology**. v. 2, 845-858, 2002.

SALHI, A.; RODRIGUES, V.Jr; SANTORO, F.; DESSEIN, H.; ROMANO, A.; CASTELLANO, L.R. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with *Leishmania braziliensis*. **Journal of Immunology**. v.180, n.9, p. 6139–48, 2008.

SAMBROOK, J.; FRITSCHI, E. F.; MANIATIS, T. **Molecular cloning: a laboratory manual**, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York, 1989.

SAUVAIN, M.; KUNESCH, N.; POISSON, J.; GANTIER, J. C.; GAYRAL, P.; DEDET, J. P. Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from the Amazonian Liana *Dolioscarpus dentatus* (Dilleniaceae). **Phytotherapy Research**. v. 10, n. 1, p. 1-4, 1996

SCHELLER J.; CHALARIS, A.; SCHMIDT-ARRAS, D.; ROSE-JOHN, S. The pro- and anti-inflammatory properties of the cytokine interleukin-6. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) Molecular Cell Research**. v.1813, n. 5, p. 878–88, 2011.

SEGOVIA, M.; ARTERO, J.M.; MELLADO, E.; CHANCE, M.L. Effects of long-term in vitro cultivation on the virulence of cloned lines of *Leishmania major* promastigotes. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**. v. 86, n. 4, p.347-354, 1992.

SEN, G.; MUKHOPADHAYA, R.; GHOSAL, J.; BISWAS, T. Combination of Ascorbate and a-Tocopherol as a Preventive Therapy against Structural and Functional Defects of Erythrocytes in Visceral Leishmaniasis. **Free Radical Research**. v.38, n. 5, p. 527–534, 2004.

SERENO, D.; HOLZMULLER, P.; MANGOT, I.; CUNY, G.; OUAISSI, A.; LEMESRE, J. P. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v.45, n.7, p.2064-2069, 2001.

SERRANO-MARTÍN, X.; PAYARES, G.; DE LUCCA, M.; MARTINEZ, J. C.; MENDOZA-LEÓN, A.; BENAİM, G. Amiodarone and Miltefosine Act Synergistically against *Leishmania mexicana* and Can Induce Parasitological Cure in a Murine Model of Cutaneous Leishmaniasis. **Antimicrobial Agents And Chemotherapy**. v. 53, n. 12, p. 5108–5113, 2009.

SGHAIER, R. M.; AISSA, I.; ATTIA, H.; BALI, A.; LEON MARTINEZ, P. A.; MKANNEZ, G.; GUERFALI, F. Z.; GARGOURI, Y.; LAOUINI, D. Treatment with synthetic lipophilic tyrosyl ester controls *Leishmania major* infection by reducing parasite load in BALB/c mice. **Parasitology**, v. 143, p. 1615–1621, 2016.

SHARMA M.; SEHGAL R.; KAUR, S. Evaluation of Nephroprotective and Immunomodulatory Activities of Antioxidants in Combination with Cisplatin against Murine Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Disease**. V.6, n.5, p. 1-16. 2012

SHAROM, F. J.; YU, X.; LU, P. et al. Interaction of the P-glycoprotein multidrug transporter (MDR1) with high affinity peptide chemosensitizers in isolated membranes, reconstituted systems, and intact cells. **Biochemical Pharmacology**. v. 4, p.571-86, 1999.

SILVA-ALMEIDA, M.; CARVALHO, L. O. P.; ABREU-SILVA, A. L.; D'ESCOFFIER, L. N.; CALABRESE, K. S. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection: muscular involvement in BALB/c and C3H.HeN mice. **Experimental Parasitology**, v. 124, p. 315-318, 2010.

SILVA, R.; SACKS, D. Metacyclogenesis is a major determinant of *Leishmania* promastigote virulence and attenuation. **Infection and Immunity**. v. 55, n. 11, p. 2802-06, 1987.

SILVA, T. O.; KREUTZ, L.C.; BARCELLOS, L.J.G.; BORELLA, J.; SOSO, A.B.; SOUZA, C. Reference values for chinchilla (*Chinchilla laniger*) blood cells and serum biochemical parameters. **Ciencia Rural**, v. 35, n. 3, p. 602-606, 2005.

SINGH, N. Drug resistance mechanisms in clinical isolates of *Leishmania donovani*. **Indian Journal of Medical Research**. v.123, p.411-422, 2006.

SINGH, G.; DEY, C. S. Induction of apoptosis-like cell death by pentamidine and doxorubicin through differential inhibition of topoisomerase II in arsenite-resistant *L. donovani*. **Acta Tropica**. v.103, n.3, p.172-185, 2007

SINGH, K.; GARG, G.; VAHAB, A. Current Therapeutics, Their Problems and Thiol Metabolism as Potential Drug Targets in Leishmaniasis. **Current Drug Metabolism**, v.17, 1-23, 2016.

SOTO, J.; ARANA, B. A.; TOLEDO, J.; RIZZO, N.; VEGA, J. C.; DIAZ, A.; LUZ, M.; GUTIERREZ, P.; ARBOLEDA, M.; BERMAN, J. D.; JUNGE, K.; ENGEL, J.; SINDERMAN, H. Miltefosine for New World cutaneous leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**. v. 38, n. 9, p. 1266–72, 2004.

SRIVASTAVA, P.; PRAJAPATI, V. K.; RAJ, M.; SUNDAR, S. Unusual case of resistance to amphotericin B in visceral leishmaniasis in a region in India where leishmaniasis is not endemic. **Journal Clinical Microbiology**. v. 49, n. 8, p. 3088-3091. 2011.

SUDHANDIRAN, G.; SHAHA, C. Antimonial-induced Increase in Intracellular Ca²⁺ through Non-selective Cation Channels in the Host and the Parasite Is Responsible for Apoptosis of Intracellular *Leishmania donovani* Amastigotes. **The Journal of Biological Chemistry**. v. 278, n. 27, p. 25120–25132, 2003

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

SUNDAR, S.; SINGH, A.; RAJ, M.; PRAJAPATI, V. K.; SINGH, A. K.; OSTYN, B.; BOELAERT, M.; DUJARDIN, J. C.; CHAKRAVARTY, J. Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. **Clinical Infectious Diseases**. v.55, n.4, p.543–550, 2012.

SUNDERKÖTTER, C.; KUNZ, M.; STEINBRINK, K.; MEINARDUS-HAGER, G.; GOEBELER, M.; BILDAU, H.; SORG, C. Resistance of mice to experimental leishmaniasis is associated with more rapid appearance of mature macrophages *in vitro* and *in vivo*. **The Journal of Immunology**. v. 151, p. 4891-4901, 1993.

SUZUKI, A.; SHIROTA, O.; MORI, K.; SEKITA, S.; FUCHINO, H.; TAKANO, A.; KUROYANAGI, M. Leishmanicidal Active Constituents from Nepalese Medicinal Plant Tulsi (*Ocimum sanctum* L.). **Chemical & Pharmaceutical Bulletin**. v. 57, n. 3, p. 245-251, 2009.

SYPEK, J.P.; CHUNG, C. L.; SUBRAMANYAM, J. M.; GOLDMAN, S. J.; SIEBURTH, D.S. Resolution of cutaneous leishmaniasis: interleukin 12 initiates a protective T helper type 1 immune response. **The Journal of Experimental Medicine**. v.177, n.6, p. 1797–1802, 1993.

TIUMAN, T. S.; BRENZAN, M. A.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; NAKAMURA, C. V. Intramuscular and topical treatment of cutaneous leishmaniasis lesions in mice infected with *Leishmania amazonensis* using coumarin (-) mammea A/BB. **Phytomedicine**. v. 19, p. 1196-1199, 2012.

TITUS, R. G.; DEKREY, G. K.; MORRIS, R. V.; SOARES, M. B. P. Interleukin-6 Deficiency Influences Cytokine Expression in Susceptible BALB Mice Infected with *Leishmania major* but Does Not Alter the Outcome of Disease. **Infection and Immunity**. v. 69, n. 8, p. 5189–5192, 2001

TRINCHIERI, G., Regulatory role of T cells producing both interferon gamma and interleukin 10 in persistent infection. **The Journal of Experimental Medicine**. v. 194, n. 10, p. F53-57, 2001.

TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. **FEMS Immunology & Medical Microbiology**. v. 51, n. 2, p. 229-242, 2007.

TSAI, I.L.; HSIEH, C.F.; DUH, C.Y.; CHEN, I.S. Further study on the chemical constituents and their cytotoxicity from the leaves of *Persea obovatifolia*. **The Chinese Pharmaceutical Journal**. v. 51, p. 335-345, 1999.

- TURETZ, M. L.; MACHADO, P. R.; KO, A. I.; ALVES, F.; BITTENCOURT, A.; ALMEIDA, R. P.; MOBASHERY, N.; JOHNSON, W. D.; CARVALHO, E. M. Disseminated Leishmaniasis: A New and Emerging Form of Leishmaniasis Observed in Northeastern Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**. v.186. p.1829-1834, 2002.
- TURNER, K. G.; VACCHINA, P.; ROBLES-MURGUÍA, M.; WADSWORTH, M.; MCDOWELL, M.; MORALES, M. A. Fitness and Phenotypic Characterization of Miltefosine- Resistant *Leishmania major*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. v. 9, n. 7, pp. e0003948, 2015.
- VAN ZANDBERGEN, G. V.; KLINGER, M.; MUELLER, A.; DANNENBERG, S.; GEBERT, A.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Neutrophil granulocyte serves as a vector for leishmania entry into macrophages. **The Journal of Immunology**. v. 173, n. 11, p. 6521-6525, 2004.
- VAN-GRIENSVEN, J.; DIRO, E. Visceral Leishmaniasis. **Infectious Disease Clinics of North America**. v. 26, p. 309–322, 2012.
- VANAERSCHOT, M.; MAES, I.; OUAKAD, M.; ADAUI, V.; MAES, L.; DONCKER, S.; RIJAL, S.; CHAPPUIS, F.; DUJARDIN, J.; DECUYPERE, S. Linking *in vitro* and *in vivo* survival of clinical *Leishmania donovani* strains. **Plos One**. v. 5, n. 8, pp. e12211, 2010.
- VANAERSCHOT, M.; DONCKER, S.; RIJAL, S.; MAES, L.; DUJARDIN, J.; DECUYPERE, S. Antimonial resistance in *Leishmania donovani* is associated with increased *in vivo* parasite burden. **Plos One**. v. 6, n. 8, p. e231, 2011.
- VANAERSCHOT, M.; DECUYPERE, S.; BERG, M.; ROY, S.; DUJARDIN, J. C. Drug-resistant microorganisms with a higher fitness—can medicines boost pathogens?. **Critical Reviews in Microbiology**. v. 39, n. 4, pp. 384-94, 2013.
- VANNIER-SANTOS, M. A.; MARTINY, A.; SOUZA, W. Cell biology of *Leishmania* spp.: invading and evading. **Current Pharmaceutical Design**. v. 8, n. 4, p. 297-318, 2002.
- VENDRAMETTO, M. C.; SANTOS, A. O.; NAKAMURA, C. V.; DIAS FILHO, B. P.; CORTEZ, D. A. G.; UEDA-NAKAMURA, T. Evaluation of antileishmanial activity of eupomatenoid-5, a compound isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallenscens*. **Parasitology International**. v. 59, p. 154–158, 2010.
- VERMA, N. K.; DEY, C. Possible Mechanism of Miltefosine-Mediated Death of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. v. 48, n. 8, p. 3010–3015, 2004.
- VILA-DEL SOL, V. DÍAZ-MUÑOZ, M. D.; FRESNO, M. Requirement of tumor necrosis factor α and nuclear factor- κ B in the induction by IFN- γ of inducible nitric oxide synthase in macrophages. **Journal of Leukocyte Biology**. v. 81, p. 272-283, 2007.

WALKER, J.; GONGORA, R.; VASQUEZ, J.J.; DRUMMELSMITH, J.; BURCHMORE, R.; ROY, G.; OUELLETTE, M.; GOMEZ, M.A.; SARAVIA, N.G. Discovery of factors linked to antimony resistance in *Leishmania panamensis* through differential proteome analysis. **Molecular & Biochemical Parasitology**. v.183, p.166–176, 2012.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – Tropical Disease Research (TDR). **Leishmaniasis**. 2012. Disponível em: <<http://www.who.int/tdr/diseases-topics/leishmaniasis/en/index.html>> Acesso em: 02 Set 2017

WORLD HEALTH ORGANIZATION - Global Health Observatory Map Gallery. **World: Distribution of Leishmaniasis** 2015A. Disponível em: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leish_CL_2015.png?ua=1> Acesso em: 02 Set 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - Global Health Observatory Map Gallery. **World: Distribution of Leishmaniasis** 2015B. Disponível em: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leish_VL_2015.png?ua=1> Acesso em: 02 Set 2017.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – **Weekly epidemiological record**. v. 92, n. 38, p. 557–572, 2017a

WORLD HEALTH ORGANIZATION – Leishmaniasis. **Situation and trends**. 2017b. Disponível em: <http://www.who.int/gho/neglected_diseases/leishmaniasis/en/> Acesso em: 02 Set 2017.

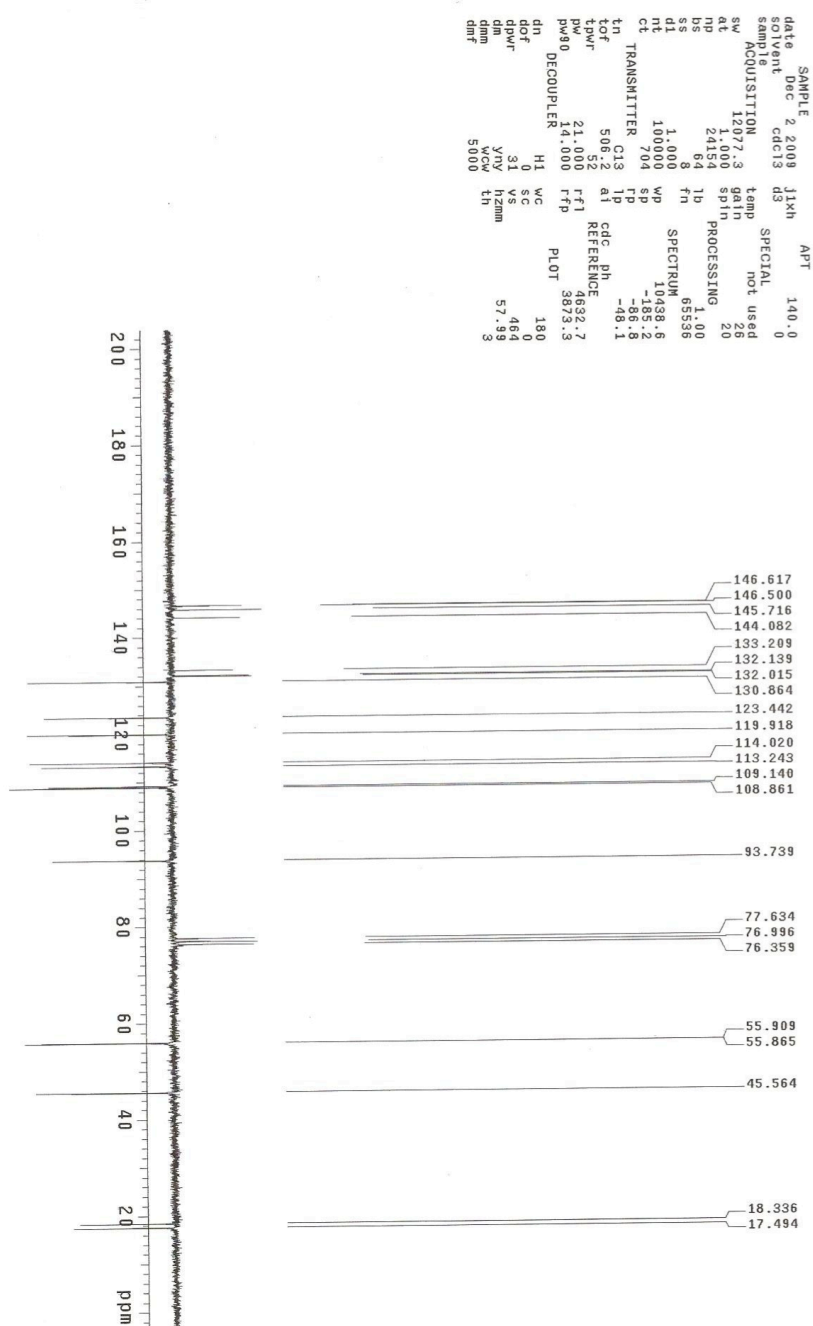
WORLD HEALTH ORGANIZATION – Leishmaniasis. **Media Centre**. 2017c. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>> Acesso em: 02 Set 2017.

WU, T.K.; WEI, C.W.; PAN, Y.R.; CHERNG, S.H.; CHANG, W.J.; WANG, H.F.; YU, Y.L. Vitamin C attenuates the toxic effect of aristolochic acid on renal tubular cells via decreasing oxidative stress-mediated cell death pathways. **Molecular Medicine Reports**. v.12, p. 6086-6092, 2015

YANG, X.; HUANG, X.; MA, L.; WU, Q.; XU, W. The Intestinal Permeability of Neolignans from the Seeds of *Myristica fragrans* in the Caco-2 Cell Monolayer Model. **Planta Medica**. v. 76, p. 1587–1591, 2010.

YI, S. Birds do it, bees do it, worms and ciliates do it too: DNA methylation from unexpected corners of the tree of life. **Genome Biology**. v.13, n.174, p. 1-3, 2012.

ANEXOS

ANEXO A – Ressonância Magnética Nuclear (RMN) ^{13}C 

ANEXO B – CEUA – Comitê de Ética no Uso de Animais

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIDÃO

João Pessoa, 17 de dezembro de 2012.

CEUA N° 0211/12

Ilmo(a). Prof(a) Dr(a) Márcia Rosa de Oliveira

Departamento **Biologia Molecular** - CCEN - UFPB

Orientando(a) : **Patrícia Lima do Nascimento Nérís, (Doutorado)**

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de **14/12/12** analisou e **APROVOU** a execução do projeto **Investigação da Atividade Biológica da Neolignana Licarina A na Terapêutica da Leishmaniose Tegumentar Experimental**.

Com previsão de empregar **231 Camundongos SWISS Fêmeas; 18 Camundongos SWISS Machos;** ; ;
; ; ; ; - ANIMAIS PROVÉM DO BIOTÉRIO Prof. Thomas George.

Para serem utilizados no período de **01/12/12 a 01/12/16**

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues

