

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

CINTHIA NÓBREGA DE SOUSA DIAS

AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE PRODUTOS
NATURAIS OBTIDOS DE *Phyllanthus acuminatus* E DE *Hyptis macrostachys*

João Pessoa – PB
2014

CINTHIA NÓBREGA DE SOUSA DIAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE PRODUTOS
NATURAIS OBTIDOS DE *Phyllanthus acuminatus* E DE *Hyptis macrostachys***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre Em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de Concentração: Farmacologia.

**Orientadoras: Dra. Márcia Rosa de Oliveira
Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas**

João Pessoa – PB
2014

CINTHIA NÓBREGA DE SOUSA DIAS

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE PRODUTOS
NATURAIS OBTIDOS DE *Phyllanthus acuminatus* E DE *Hyptis macrostachys***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre Em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Área de Concentração: Farmacologia.

Data da aprovação ____/____/____

Banca Examinadora

Prof^a. Dra. Márcia Rosa de Oliveira (Orientadora)
(Universidade Federal da Paraíba – UFPB)

Prof^a. Dra. Sandra Rodrigues Mascarenhas (Orientadora)
(Universidade Federal da Paraíba – UFPB)

Prof. Dr. Lindomar José Pena
(Universidade Federal da Paraíba – UFPB)

Prof^a. Dra Marianna Vieira Sobral
(Universidade Federal da Paraíba – UFPB)

Ao meu amado
esposo Jairo, pelo
apoio, compreensão e
amor. **Dedico.**

AGRADECIMENTOS

Primeiramente, o mais importante agradecimento a Deus, por seu amor, misericórdia, graça, cuidado, proteção e por ter me permitido chegar até aqui. Pelo seu plano em minha vida.

Aos meus pais, Pedro e Suely, pois sem o seu apoio não estaria concluindo essa etapa tão importante em minha vida.

A minha linda avó Francisca (“minha voinha”), pelo seu apoio nos momentos mais difíceis durante meu crescimento.

Ao meu esposo Jairo, pelo amor, cuidado, compreensão e por me fazer sorrir sempre que preciso, bem como pelo apoio incondicional em todas as situações.

Aos meus familiares – tios (as) e primos (as) – pelo carinho de sempre, e por toda torcida pelo meu sucesso.

À minha orientadora, Prof. Dra. Márcia Rosa de Oliveira, por acreditar em mim, pelos ensinamentos, pelo apoio, paciência e confiança.

Aos meus colegas do Laboratório de Biologia de Leishmania, a Klinger por toda ajuda nos experimentos, pelas dicas e por deixar que eu aperreasse qualquer hora, a Patrícia, minha “Có”, por me ajudar em tudo que precisei, pela ajuda nos experimentos e muitas outras coisas! A Juliana, pela companhia em muitos momentos, e por ter me introduzido no laboratório de forma tão generosa. Obrigada a todos vocês!

À Prof. Dr. Sandra Mascarenhas, pela sua ajuda em um momento inesperado desse mestrado e pela colaboração nos ensaios de ELISA, e ao seu aluno Luís pelo auxílio no experimento de citocinas.

À técnica de laboratório, dona Rosângela, pela amizade e por toda a ajuda no laboratório. E aos demais técnicos do Departamento de Biologia Molecular, em especial Seu Bosco, pelo socorro nos imprevistos.

Ao Prof. Dr. Josean Fachine, por ceder às substâncias utilizadas nesse trabalho e a seus alunos Susyanne e Vicente.

Aos professores membros da banca examinadora Prof. Dr. Lindomar José Pena, Prof^a. Dra. Marianna Vieira Sobral e Prof^a. Dra. Márcia Regina Puivezam, pela disponibilidade em contribuir para o enriquecimento deste trabalho.

Aos colegas da turma “mista” do mestrado 2012.1-2013.1 do PPgPNSB, em especial a Lílían, Lucas, Luiz Henrique, Camila, pela amizade e ajuda em momentos do mestrado.

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

À Crispim, do Biotério Thomas George (LTF/UFPB), pelo apoio com os animais.

À Carol, secretária da Pós-graduação, por toda ajuda durante o mestrado.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e a Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES) pelo apoio financeiro.

A Universidade Federal da Paraíba, instituição que abriu as portas para que eu chegasse até aqui, onde conclui minha graduação e agora minha pós-graduação.

RESUMO

DIAS, C.N.S. **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DE PRODUTOS NATURAIS ISOLADOS DE *Phyllanthus acuminatus* E DE *Hyptis macrostachys***- Dissertação, 113p. Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, 2014.

As leishmanioses são um complexo de doenças parasitárias inseridas no grupo de doenças tropicais negligenciadas. Os principais medicamentos utilizados na terapêutica das leishmanioses são antimoniais pentavalentes e anfotericina B. Contudo, esses medicamentos estão associados a sérios efeitos colaterais. Portanto, é necessária a busca de novas drogas leishmanicidas. Nesse contexto, os produtos naturais são uma fonte de novas moléculas ativas. Neste trabalho, investigou-se a atividade antileishmania do extrato etanólico de *Phyllanthus acuminatus* e Justicidina B, lignana obtida dessa planta, bem como o extrato etanólico, a fase diclorometano e o Hiptenolideo, obtidos de *Hyptis macrostachys* em modelos experimentais *in vitro*. Todas as amostras avaliadas apresentaram atividade antileishmania, demonstrada inicialmente pela inibição de crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* em fase logarítmica de crescimento. A concentração que inibe 50% do crescimento (CI₅₀) para as substâncias avaliadas foi de 35,58µg/mL para o extrato etanólico de *P. acuminatus*, 12,51µg/mL para Justicidina B; 280,69µg/mL para o extrato etanólico de *H. macrostachys*, 55,3µg/mL para fase diclorometano de *H. macrostachys* e 22,67µg/mL para o Hiptenolideo. Essas amostras também foram avaliadas quanto à citotoxicidade em macrófagos peritoneais murinos de camundongos suíços, o que resultou na medida da concentração citotóxica para 50% dos macrófagos (CC₅₀), que foram de 39,62µg/mL para o extrato etanólico de *P. acuminatus*, 58,56µg/mL para Justicidina B; 121,36µg/mL para o extrato etanólico de *H. macrostachys*, 40,45µg/mL para fase diclorometano de *H. macrostachys* e 61,78µg/mL para o Hiptenolideo. Esses dados de CI₅₀ e CC₅₀ resultaram no Índice de Seletividade que foram de 1,11 para o extrato etanólico de *P. acuminatus*; 4,68 para Justicidina B; 0,43 para o extrato etanólico de *H. macrostachys*; 0,73 para fase diclorometano de *H. macrostachys* e 2,72 para o Hiptenolideo. Diante desses resultados, foi selecionada a lignana Justicidina B para aprofundar os estudos de atividade antileishmania sobre *L. amazonensis*. Na avaliação do padrão de fragmentação do DNA de formas promastigotas de *L. amazonensis* observou-se que a Justicidina B na maior concentração avaliada (4x IC₅₀) foi capaz de induzir a fragmentação do DNA semelhante ao observado no controle positivo H₂O₂ (4mM). Em modelo de infecção de macrófagos com *L. amazonensis* e tratados com a lignana Justicidina B observou-se redução tanto da porcentagem de macrófagos infectados quanto do número de amastigotas por macrófago infectado, resultando em uma redução no índice de infecção quando comparados ao controle, resultando em concentração efetiva para diminuir 50% da infecção (EC₅₀) de 9,14 e 3,58 para 24 horas e 72 horas de tratamento. Esse resultado foi correlacionado com uma atividade imunomoduladora dessa lignana, associada à diminuição nos níveis de interleucina (IL)-10, e a um aumento nos níveis de óxido nítrico (NO). Pode-se concluir que a lignana Justicidina B possui significativa atividade antipromastigota e antiamastigota e apresenta propriedades imunomodulatórias em modelos de infecção *in vitro*.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*, Lignana, Justicidina B, antileishmania, imunomodulação.

ABSTRACT

DIAS, C.N.S. **EVALUATION OF THE ANTILEISHMANIAL ACTIVITY OF NATURAL PRODUCTS ISOLATED FROM *Phyllanthus acuminatus* AND *Hyptis macrostachys***. Dissertação, 113p. Programa de Pós-Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos. Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, 2014.

Leishmaniasis is a complex of inserted parasitic diseases in the group of neglected tropical diseases. The drugs used primarily in the treatment of leishmaniasis are pentavalent antimonials and amphotericin B. However, these drugs are associated with serious side effects. Therefore, it is necessary to search for new antileishmanial drugs. In this context natural products are a source of new active molecules. This study, it was investigated the antileishmanial activity of the ethanol extract of *Phyllanthus acuminatus* and Justicidin B, lignan obtained from this plant and the ethanol extract, the dichloromethane phase and Hyptenolide obtained from *Hyptis macrostachys* *in vitro* experimental models. All samples assessed showed antileishmanial activity, initially demonstrated by inhibition of growth of *L. amazonensis* promastigotes in logarithmic growth phase. The concentration that inhibits 50% of growth (IC₅₀) for the tested substances was 35.58 µg /mL for the ethanolic extract of *P. acuminatus*, 12.51 µg/mL for Justicidin B; 280.69 µg/mL for the ethanol extract of *H. macrostachys*, 55.3 µg/mL for dichloromethane phase of *H. macrostachys* and 22.67 µg/mL for Hyptenolide. These samples were also evaluated for cytotoxicity in murine peritoneal macrophages of swiss mice, which resulted in the measurement of the cytotoxic concentration for 50% macrophages (CC₅₀), which were 39.62 µg/mL for the ethanolic extract of *P. acuminatus*, 58.56 µg/ml for Justicidin B; 121,36 µg/mL for the ethanol extract of *H. macrostachys*, 40.45 µg/mL for dichloromethane phase of *H. macrostachys* and 61.78 µg/ml for Hyptenolide. These data resulted in IC₅₀ and CC₅₀ resulted in a selectivity index of 1.11 for the ethanol extract of *P. acuminatus*; 4.68 for Justicidin B; 0.43 for the ethanol extract of *H. macrostachys*; 0.73 to dichloromethane phase of *H. macrostachys* and 2.72 to Hyptenolide. Given these results, we selected the lignan Justicidina B for further study of antileishmanial activity against *L. amazonensis*. In the evaluation of the DNA fragmentation pattern of *L. amazonensis* promastigotes, it was observed in higher concentration evaluated of Justicidin B (4x IC₅₀) induction of DNA fragmentation similar to that observed in the positive control H₂O₂ (4mM). In infection model macrophage with *L. amazonensis* and treated with lignan Justicidin B showed reduction in both the percentage of infected macrophages as the number of amastigotes per infected macrophage, resulting in a reduction in the rate of infection compared to control, resulting decrease in the effective concentration for 50% of infection (EC₅₀) of 9.14 and 3.58 for 24 hours and 72 hours after treatment. This result was correlated with an immunomodulatory activity of this lignan, associated with decreased levels of interleukin (IL) -10, and increased levels of nitric oxide (NO). It can be concluded that the lignan Justicidin B has significant activity antipromastigote and antiamastigote and presents immunomodulatory properties in models of infection *in vitro*.

Keywords: *Leishmania amazonensis*, Lignan, Justicidin B, antileishmania, immunomodulation.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Concentração inibitória de 50% do crescimento (IC_{50}) de promastigotas de *Leishmania amazonensis*; Concentração citotóxica para 50% de macrófagos peritoneais murinos (CC_{50}). Índice de Seletividade (CC_{50}/IC_{50}).....66

Tabela 2 – Concentração efetiva para diminuir 50% (EC_{50}) da infecção após 24 horas e 72 horas de tratamento com Glucantime[®]78

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Mapa de distribuição das leishmanioses no Mundo.....	17
Figura 2 – Manifestações clínicas das leishmanioses.....	20
Figura 3 – Taxonomia de <i>Leishmania</i>	21
Figura 4 – Fotomicrografia das duas formas morfológicas do gênero <i>Leishmania</i>	22
Figura 5 – Hospedeiro invertebrado e reservatórios silvestres de <i>Leishmania sp.</i>	23
Figura 6 – Ciclo de vida de <i>Leishmania</i> em um vetor competente.....	25
Figura 7 – Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	26
Figura 8 – Estrutura química da Justicidina B.....	42
Figura 9 – Estrutura química do Hiptenolideo.....	43
Figura 10 – Experimento de atividade antipromastigota com <i>Leishmania amazonensis</i>	46
Figura 11 – Retirada de lavado peritoneal.....	48
Figura 12 – Esquema de ensaio de viabilidade celular.....	49
Figura 13 – Esquema do ensaio de infecção com formas promastigotas e amastigotas axênicas.....	52
Figura 14 – Esquema da dosagem de NO.....	55
Figura 15 – DNA genômico de <i>L. amazonensis</i> tratados com diferentes concentrações de Justicidina B ou com H ₂ O ₂ 4mM, em gel de agarose (1%).....	67
Figura 16 – Fotomicrografia de formas amastigotas axênicas de <i>Leishmania amazonensis</i>	68
Figura 17 – Fotomicrografia de macrófagos peritoneais murinos infectados com <i>L. amazonensis</i>	69
Figura 18 – Macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com diferentes concentrações de Justicidina B.....	73

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 – Inibição do crescimento de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> na presença de diferentes concentrações do Extrato EtOH de <i>Phyllanthus acuminatus</i> e Justicidina B.....	58
Gráfico 2 – Inibição do crescimento de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> na presença de diferentes concentrações do Extrato EtOH, Fase diclorometano (DCM) e Hiptenolideo obtidos de <i>H. macrostachys</i>	59
Gráfico 3 – Inibição do crescimento de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> na presença de diferentes concentrações de Anfotericina B® e Glucantime®	60
Gráfico 4 – Citotoxicidade do Extrato EtOH de <i>P. acuminatus</i> e da lignana Justicidina B frente a macrófagos peritoneais murinos.....	62
Gráfico 5 – Citotoxicidade do extrato EtOH, fase DCM e Hiptenolideo obtidos de <i>Hyptis macrostachys</i> frente a macrófagos peritoneais murinos.....	63
Gráfico 6 – Citotoxicidade do Glucantime® frente a macrófagos peritoneais murinos.....	65
Gráfico 7 – Porcentagem de infecção de macrófagos infectados com amastigotas axênicas e promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	69
Gráfico 8 – Número de amastigotas por macrófago infectado com amastigotas axênicas e promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	70
Gráfico 9 – Índice de infecção de macrófagos infectados com amastigotas axênicas e promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	70
Gráfico 10 – Efeito da Justicidina B sobre a porcentagem de macrófagos infectados com formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	72
Gráfico 11 – Efeito da Justicidina B sobre o número de amastigota por macrófago infectado com formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	74
Gráfico 12 – Efeito da Justicidina B sobre o índice de infecção de macrófagos infectados com formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	75
Gráfico 13 – Efeito Glucantime® sobre a porcentagem de macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i>	76
Gráfico 14 – Efeito do Glucantime® sobre o número de amastigota por macrófago infectado com formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	77
Gráfico 15 – Efeito do Glucantime® sobre o índice de infecção de macrófagos infectados com formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	78
Gráfico 16 – Níveis da citocina IL-12 no sobrenadante de macrófagos murinos infectados com <i>L. amazonensis</i>	80
Gráfico 17 – Níveis da citocina IL-6 no sobrenadante de macrófagos murinos infectados com <i>L. amazonensis</i>	80

Gráfico 18 – Níveis da citocina IL-10 no sobrenadante de macrófagos murinos infectados com <i>L. amazonensis</i>	81
Gráfico 19 – Níveis de nitrito produzido por macrófagos murinos infectados com <i>L. amazonensis</i>	82

LISTA DE ABREVIATURAS

CD – Célula Dendrítica
CD4+ – Linfócito T auxiliar dotado do receptor CD4.
CFU-GM – Unidade formadora de colônia-granulocítica/monocítica
DCM – Diclorometano
DMSO – Dimetilsulfóxido
DNA – Ácido desoxirribonucleico (desoxiribonucleic acid)
EtOH – Etanólico
IC50 – Concentração inibitória de 50% do crescimento
IFN- γ – Interferon gama
IL-2 – Interleucina 2
IL-4 – Interleucina 4
IL-6 – Interleucina 6
IL-10 – Interleucina 10
IL-12 – interleucina 12
IL-13 – Interleucina 13
iNOS – Sintase induzida do óxido nítrico
LCD – Leishmaniose cutânea difusa
LCL – Leishmaniose cutânea localizada
LD – Leishmaniose disseminada
LCF – Fator quimiotático de *Leishmania*
LMC – Leishmaniose mucocutânea
LTA – Leishmaniose Tegumentar Americana
LV – Leishmaniose Visceral
MIP-1 β – Proteína inflamatória macrofágica-1 β (monocyte inflammatory protein 1 β)
MOI – Multiplicity of infection
MP – Matriz peritrófica
NK – Célula natural killer
NNN – Meio sólido Novy, McNeal e Nicolle
NO – Óxido nítrico (nitric oxide)
OMS – Organização Mundial da Saúde
PBS – Tampão fosfato salino (phosphate buffered saline)
ROS – Espécies reativas do oxigênio
SbIII – Antimonial trivalente
SBF – Soro bovino fetal
SbV – Antimonial pentavalente
TGF- β – Fator transformador do crescimento β (transforming growth factor β)
Th1 – Linfócito T auxiliar tipo 1
Th2 – Linfócito T auxiliar tipo 2
TNF- α – Fator de necrose tumoral α (tumour necrosis factor α)

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	16
1.1 Leishmanioses	16
1.2 Caracterização e ciclo de vida de <i>Leishmania sp</i>	20
1.3 Resposta imunológica na infecção por <i>Leishmania sp</i>	27
1.4 Tratamento das Leishmanioses	30
1.5 Produtos naturais e substâncias isoladas	33
2. OBJETIVOS.....	39
2.1 Objetivo Geral	39
2.2 Objetivos Específicos.....	39
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	41
3.1 Obtenção das amostras avaliadas	41
3.1.1 Obtenção do Extrato EtOH de <i>Phyllanthus acuminatus</i> e da lignana Justicidina B.....	41
3.1.2 Obtenção do Extrato EtOH, Fase DCM e α pirona Hiptenolideo de <i>Hyptis macrostachys</i>	42
3.2 Preparo das soluções das substâncias avaliadas	43
3.3 Parasitas e manutenção das culturas <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i>	44
3.4 Avaliação da atividade antipromastigota e determinação da concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos (CI ₅₀)	44
3.5 Análise de fragmentação de DNA por eletroforese em gel de agarose	46
3.6 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos murinos através do corante vital azul de tripan	48
3.7 Padronização da infecção de macrófagos murinos infectados <i>in vitro</i> com formas promastigotas e amastigotas axênicas de <i>Leishmania amazonensis</i>	50
3.7.1 Preparo das formas amastigotas axênicas	50
3.7.2 Preparação de macrófagos peritoneais utilizados na infecção	50
3.7.3 Avaliação da infecção promovida por formas promastigotas e amastigotas axênicas de <i>L. amazonensis</i>	51
3.8 Avaliação da atividade anti-amastigota de Justicidina B.....	52
3.9 Detecção de citocinas através de ensaio imunoenzimático	53
3.10 Determinação dos níveis de óxido nítrico (NO)	54
3.11 Análise estatística	55
4. RESULTADOS.....	57

4.1 Atividade antileishmania de substâncias sobre formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i>	57
4.1.1 Atividade antileishmania do extrato etanólico de <i>Phyllanthus acuminatus</i> e da lignana Justicidina B	57
4.1.2 Atividade antileishmania do extrato etanólico, fase diclorometano e da nova pirona Hiptenolideo	58
4.1.3 Atividade antileishmania de Anfotericina B [®] e Glucantime [®]	60
4.2 Avaliação da citotoxicidade das substâncias testadas em células de mamíferos	61
4.2.1 Atividade citotóxica de <i>Phyllanthus acuminatus</i> e da lignana Justicidina B frente a macrófagos peritoneais murinos	61
4.2.2 Atividade citotóxica do Extrato etanólico e Fase DCM de <i>Hyptis macrostachys</i> e da α - pirona Hiptenolideo frente a macrófagos peritoneais murinos	63
4.2.3 Atividade citotóxica do Glucantime [®] frente a macrófagos peritoneais murinos	64
4.3 Determinação do índice de seletividade das substâncias em estudo	65
4.4 Análise na fragmentação do DNA em formas promastigotas tratadas com a lignana Justicidina B	66
4.5 Padronização de infecção de macrófagos peritoneais murinos frente a amastigotas axênicas e promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	68
4.5.1 Transformação de promastigotas em amastigotas axênicas	68
4.5.2 Infecção de macrófagos peritoneais murinos	68
4.6 Macrófagos murinos infectados com <i>L. amazonensis</i> tratados com Justicidina B	71
4.7 Análise da atividade imunomoduladora da Justicidina B sobre macrófagos infectados com <i>Leishmania amazonensis</i>	79
5. DISCUSSÃO	84
6. CONCLUSÕES	94
REFERÊNCIAS	96
ANEXO	113

1 INTRODUÇÃO

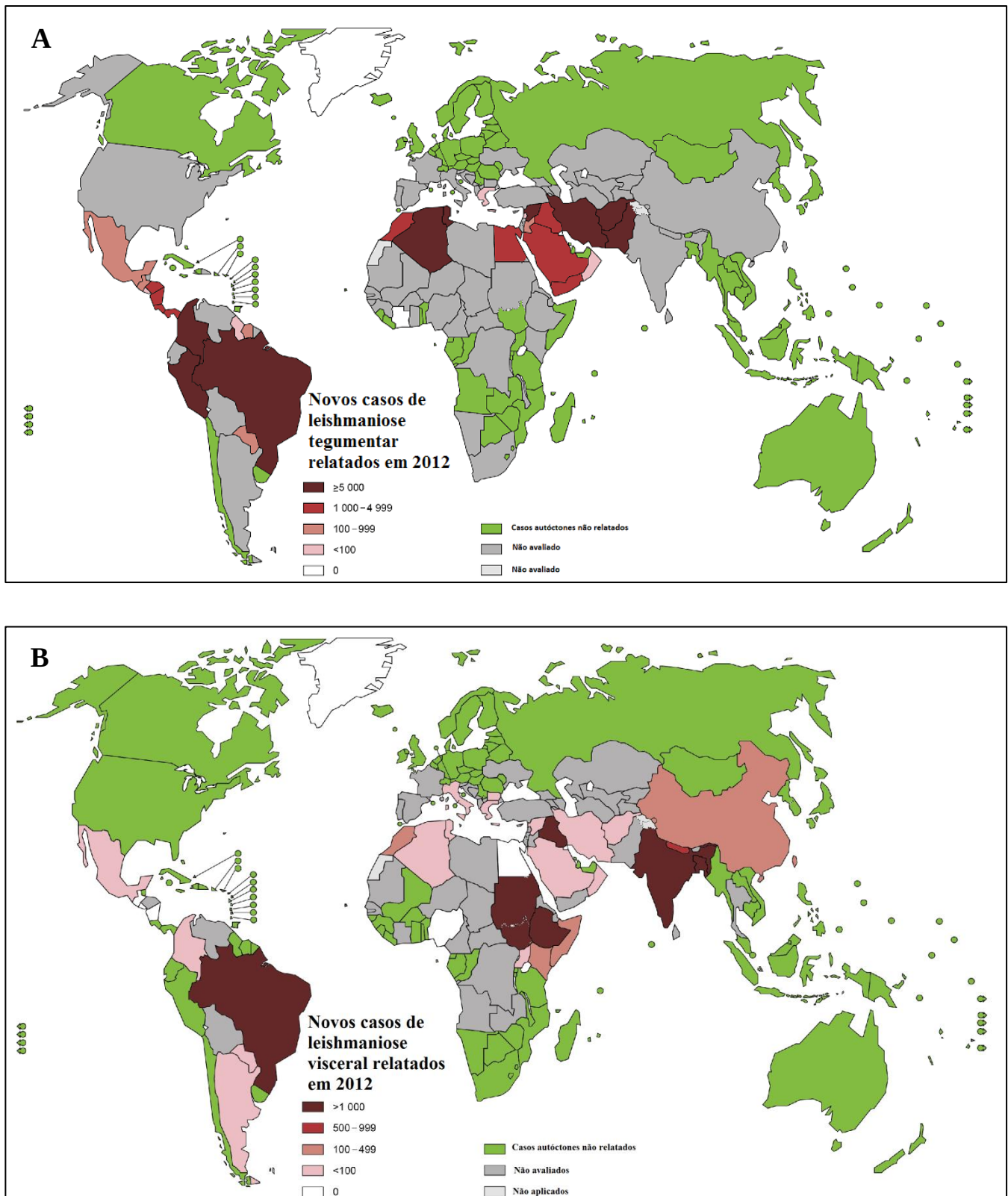
1. INTRODUÇÃO

1.1 Leishmanioses

As Leishmanioses são um complexo de doenças causadas por protozoários parasitos do gênero *Leishmania*, incluso no grupo de Doenças Tropicais Negligenciadas (CONTEH et al., 2010). A leishmaniose é classificada como uma das mais negligenciadas das doenças, levando em conta os poucos recursos aplicados em diagnóstico, tratamento, controle e sua forte associação com a pobreza (BERN et al., 2008). Afetam principalmente pessoas em condições sócio-econômicas desfavoráveis e está associado à desnutrição, deslocamento populacional, condições precárias de habitação e sistema imunológico deficiente. Durante os últimos 10 anos, houve uma expansão dessas enfermidades devido a fatores como as mudanças ambientais oriundas de desmatamentos, construções de barragens, sistemas de irrigação e urbanização. Estima-se que 1,3 milhões de novos casos e cerca de 20.000 a 30.000 mortes ocorrem anualmente (WHO, 2013).

A depender da espécie envolvida e o padrão imunológico do paciente, a doença causada por espécies do gênero *Leishmania* pode se manifestar em diferentes formas clínicas. De acordo com a forma clínica apresentada, as leishmanioses podem dividir-se em dois tipos principais, a leishmaniose tegumentar (LT), caracterizada por infecção confinada na derme, e a leishmaniose visceral (LV), quando a infecção acomete órgãos internos do indivíduo. A LT é subdividida em leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose cutânea difusa (LCD), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose disseminada (LD) (GOTO; LINDOSO, 2012).

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), a maioria dos casos de leishmaniose cutânea são relatados no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, República Islâmica do Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e República Árabe da Síria (Figura 1A) (WHO, 2014). Já para a leishmaniose visceral estima-se que mais de 90% dos casos ocorrem em Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão (Figura 1B). O Brasil é o único país incluso no grupo de maioria de casos relatados para os dois tipos de formas clínicas.

Figura 1- Mapa de distribuição das leishmanioses no Mundo.

Fonte: WHO, 2014. (A) Distribuição da leishmaniose tegumentar. A maioria dos casos ocorre no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, a República Islâmica do Irã, Paquistão, Peru, Arábia Saudita e República Árabe da Síria. (B) Distribuição da leishmaniose visceral. Mais de 90% dos casos ocorrem no Brasil, Bangladesh, Etiópia, Índia, Sudão do Sul e Sudão.

A leishmaniose cutânea localizada é a forma mais prevalente, caracterizada por lesões ulcerosas ou nodulares que se desenvolvem perto ou no local da picada do mosquito (Figura 2A). Normalmente, a úlcera é indolor, rosada, arredondada, com bordas bem delimitadas e elevadas, assim como uma base endurecida. A cura espontânea pode ocorrer, deixando uma lisa e fina cicatriz hipopigmentada. No entanto, alguns casos raros podem evoluir para outras formas clínicas mais severas (REITHINGE et al., 2007; DAVID; CRAFT, 2009; GOTO; LINDOSO, 2012; MCGWIRE; SATOSKAR, 2013). É mais frequentemente causada por espécies de *Leishmania major* e *Leishmania tropica* no Velho Mundo e por *Leishmania braziliensis*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania guyanensis*, *Leishmania panamensis* e *Leishmania amazonensis* no Novo Mundo (MCGWIRE; SATOSKAR, 2013).

A leishmaniose cutânea difusa é causada principalmente por *L.amazonensis* e *L. mexicana* no Novo Mundo e *Leishmania aethiopica* no Velho Mundo (DAVID; CRAFT, 2009; GOTO; LINDOSO, 2012) e é caracterizada por lesões nodulares e não ulcerativas carregadas de parasitos que se disseminam a partir do local inicial da infecção e podem cobrir o corpo inteiro do paciente (Figura 2B) (AZEREDO-COUTINHO et al., 2007; REITHINGE et al., 2007). Ocorre principalmente em indivíduos com deficiência em resposta imune mediada por células. As consequências dessa infecção são devastadoras para o paciente devido à severidade das lesões, as quais não cicatrizam espontaneamente e estão sujeitas a recaída após o tratamento com as drogas atualmente disponíveis (DESJEUX, 2004; AZEREDO-COUTINHO et al., 2007).

A leishmaniose mucocutânea é caracterizada pela presença de lesões crônicas, as quais resultam na destruição do tecido do nariz, boca e oro-nasofaringe, podendo progredir, causando destruição de pálpebras e levar ao desfiguramento da face. A progressão das lesões pode afetar a função respiratória e digestiva (Figura 2C). É causada principalmente por *Leishmania braziliensis*, e esses danos ao paciente são observados provavelmente por essa espécie apresentar um tropismo por macrófagos das regiões da oro-nasofaringe, onde há produção de um granuloma e consequente destruição dessas regiões (AMATO et al., 2007; GUERRA et al., 2011; MCGWIRE; SATOSKAR, 2013). Outras espécies como *L. panamensis*, *L. guyanensis* e *L. amazonensis* no Novo Mundo e *L. major* e *L. infantum* no Velho Mundo também têm

sido associadas a essa forma clínica (REITHINGE et al., 2007; GOTO; LINDOSO, 2012).

A forma clínica disseminada é caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões pleomórficas provenientes de disseminação hematogênica ou linfática, podendo ocorrer entre 10 e 300 lesões localizadas em duas ou mais áreas do corpo não adjacentes. As lesões são acneiformes, ulceradas e papulares. No Brasil, esse tipo de leishmaniose é principalmente causada por *L. braziliensis*, embora outras espécies não possam ser excluídas (GOTO; LINDOSO, 2012).

A leishmaniose visceral também é chamada de calazar (kala-azar = febre negra em hindu) devido a uma hiperpigmentação que era descrita em pacientes com LV no subcontinente indiano (CHAPPUIS et al., 2007). É considerada uma infecção crônica grave e potencialmente fatal para o homem quando não tratada em tempo hábil. Resulta da invasão dos parasitos da corrente sanguínea para os fagócitos do sistema reticuloendotelial a partir do local inicial da infecção cutânea (Figura 2D). É causada por *Leishmania donovani* (em regiões da Índia, Paquistão, China e África) e *Leishmania infantum* (na região do Mediterrâneo). No Novo Mundo, principalmente no Brasil, a leishmaniose visceral é causada por *Leishmania chagasi* (sinon. *L. infantum*) (CHAPPUIS et al., 2007; MCGWIRE; SATOSKAR, 2013). Os sintomas associados a essa forma clínica são: febre ondulante, perda de peso, esplenomegalia, hepatomegalia e/ou linfadenopatias e anemia (DESJEUX, 2004).

Figura 2- Manifestações clínicas das leishmanioses.

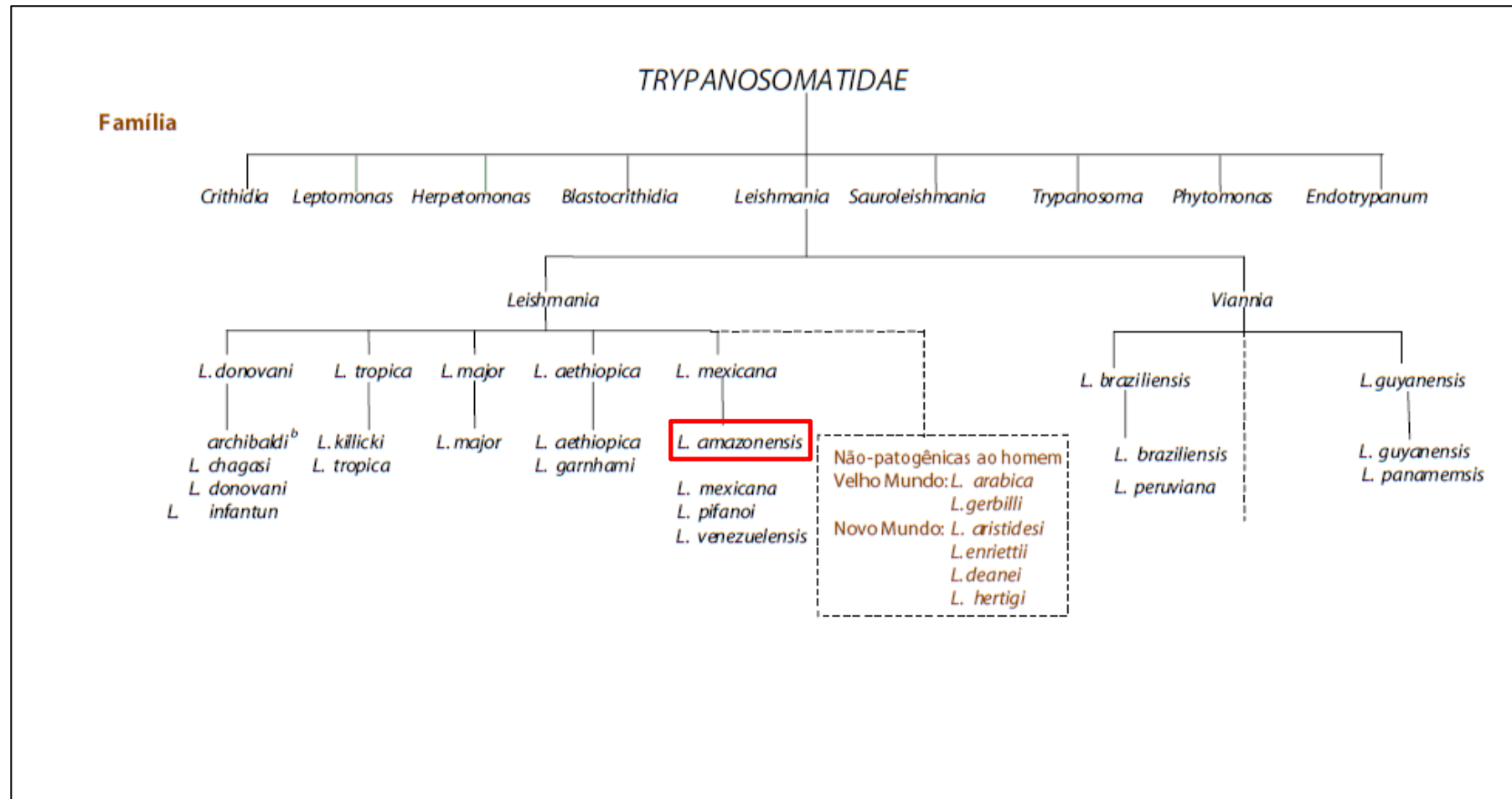


Fonte: CHAPPUIS et al., 2007; BRASIL, 2007 (A) Paciente com leishmaniose cutânea localizada (B) Leishmaniose cutânea difusa (C) Leishmaniose mucocutânea (D) Leishmaniose visceral.

1.2 Caracterização e ciclo de vida de *Leishmania* sp.

Parasitas do gênero *Leishmania* pertencem ao Filo Protozoa da Ordem Kinetoplastida e à família Trypanosomatidae, sendo esse gênero dividido em dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia* (Figura 3). A divisão original dos dois subgêneros foi descrita por Lainson e colaboradores, a qual foi baseada na porção do intestino do flebotomíneo que era colonizada pelo parasita (LAINSON; SHAW, 1987) e vem sendo confirmada ao longo do tempo por análises filogenéticas (BAIDOURI, 2013).

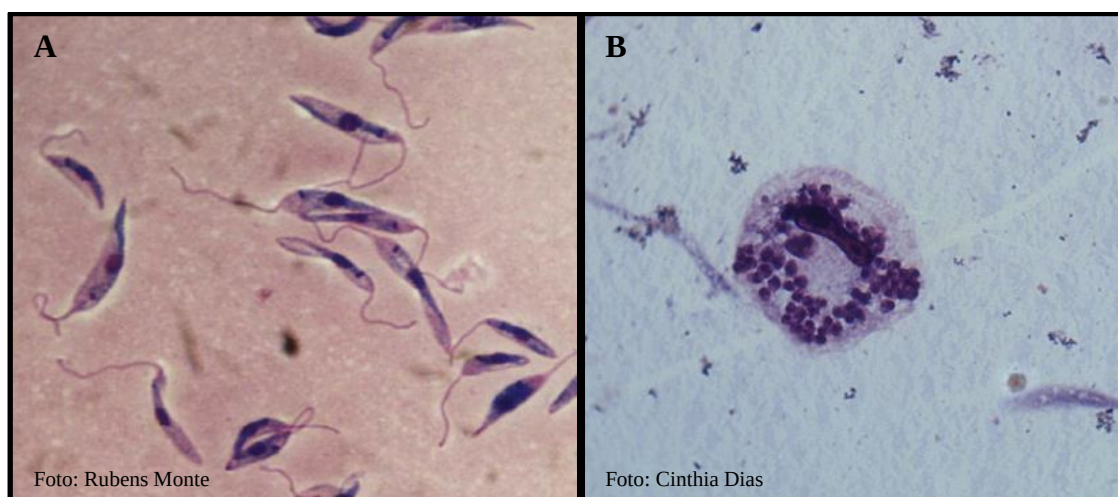
Figura 3- Taxonomia de *Leishmania*.



Fonte: BRASIL, 2010a. Em destaque a espécie utilizada no presente trabalho.

Esses parasitos possuem um ciclo de vida heteroxênico (PEREIRA; BRANDÃO, 2013) que consiste em duas formas morfológicas ao longo de seu ciclo de vida. A forma promastigota, consiste em uma célula flagelada móvel que vive no intestino do inseto vetor, já a outra forma, a amastigota, vive no interior de células do sistema imune monocítico fagocitário em hospedeiros vertebrados (Figura 4) (BURCHMORE; BARRETT, 2001). Promastigotas e amastigotas diferem morfolologicamente e bioenergeticamente, sendo descritas diferenças como a utilização de ácidos graxos e enzimas envolvidas na via glicolítica (COOMBS et al., 1982). Não surpreendentemente, a suscetibilidade de amastigotas e promastigotas frente a compostos também é diferente (CALLAHAN et al., 1997; SCHMIDT et al., 2012).

Figura 4- Fotomicrografia das duas formas morfológicas do gênero *Leishmania*.

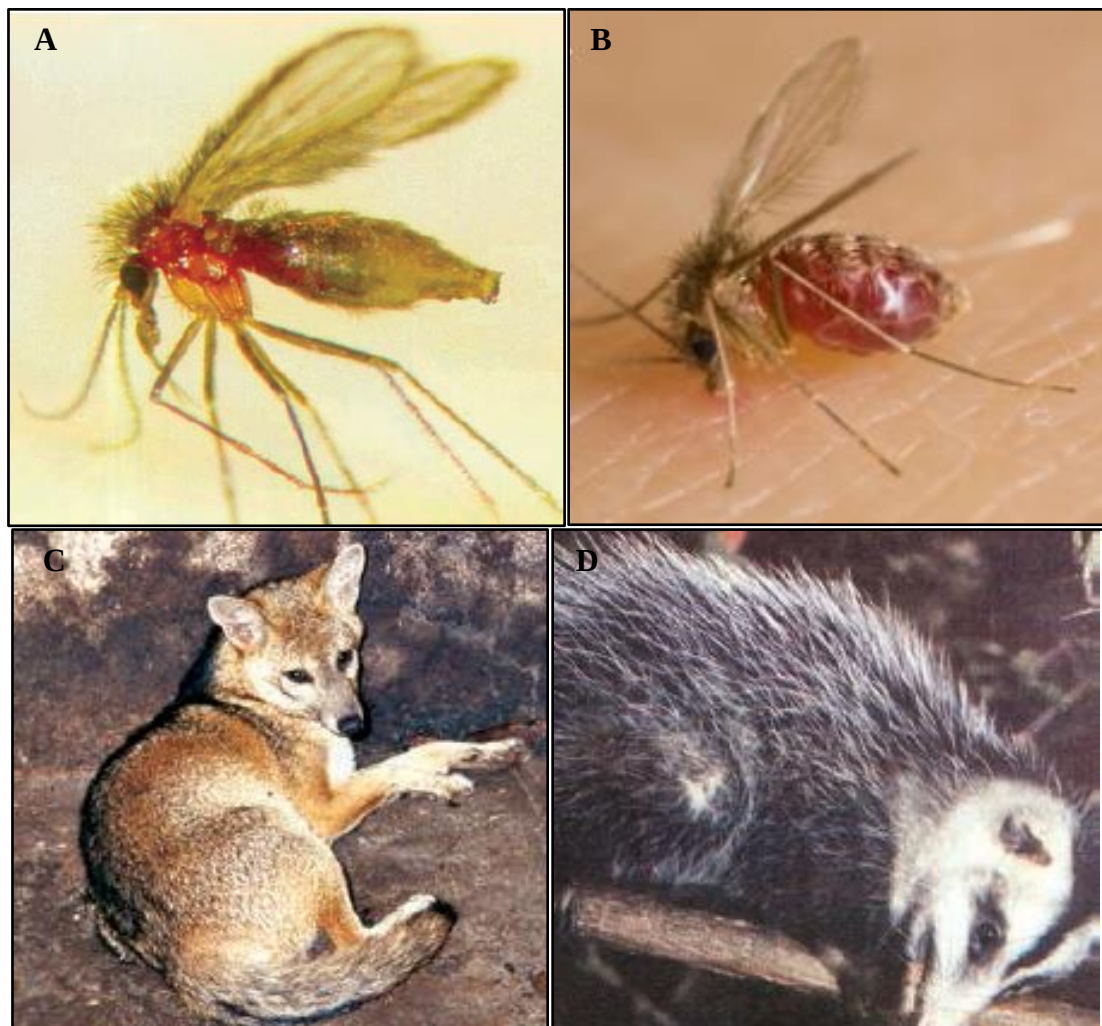


Fonte: Laboratório de Leishmanioses DBM/UFPB. (A) cultura de promastigotas de *Leishmania chagasi*. (B) Fotomicrografia de macrófago infectado com formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*. Coloração hematológica panótico rápido. Aumento: 1000x.

Insetos dípteros da família Psychodidae, subfamília Phlebotominae são vetores de várias espécies de *Leishmania*. Na família Psychodidae foram descritas até o momento cerca de 700 espécies. Dessa família destacam-se dois gêneros específicos, o gênero *Lutzomyia* (Figura 5A), no Novo Mundo e o gênero *Phlebotomus* (Figura 5B) no Velho Mundo (KAMHAWI, 2006; BATES, 2007). Os principais reservatórios das leishmanioses incluem diversas espécies de vertebrados, como exemplo o cão doméstico (*Canis familiaris*), considerado a principal fonte de infecção na área urbana. No ambiente silvestre são tidos como os principais reservatórios as raposas (*Dusicyon*

vetulus e *Cerdocyon thous*) (Figura 5C) e os gambás (*Didelphis albiventris*) (Figura 5D) (BRASIL, 2013).

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

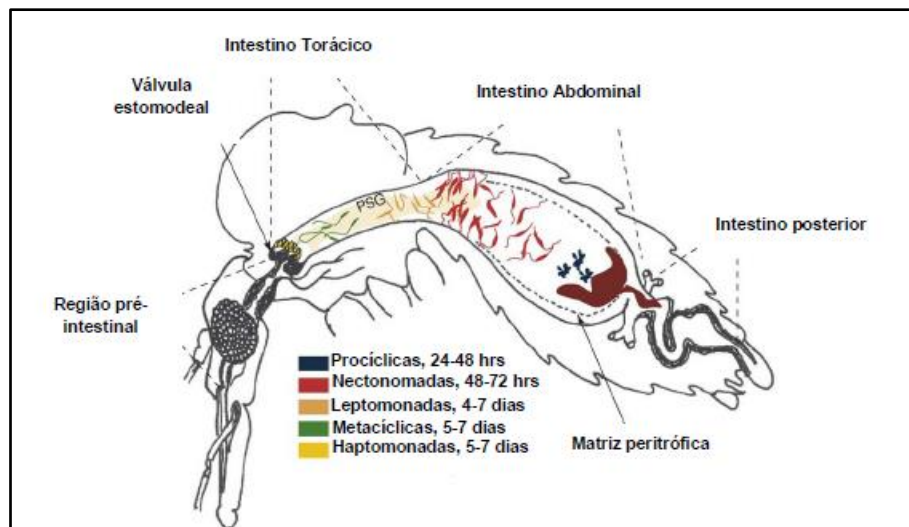


Fonte: BRASIL, 2006; BRASIL, 2007. (A) *Lutzomyia longipalpis*; (B) *Phlebotomus papatasi*; (C) Raposa - *Dusicyon vetulus* (D); Gambá - *Didelphis albiventris*.

No hospedeiro invertebrado o ciclo de vida do parasito inicia-se quando o flebotomíneo alimenta-se de um mamífero infectado e ingere as formas amastigotas presentes na circulação sanguínea (BATES; ROGERS, 2004). No intestino do vetor, o sangue contendo as formas amastigotas fica envolvido por uma estrutura quitinosa, secretada pelo epitélio do intestino, denominada matriz peritrófica (MP), a qual separa as formas amastigotas do intestino médio e as tornam relativamente resistentes ao ataque de enzimas digestivas (KAMHAWI, 2006).

Durante o ciclo de vida no vetor (Figura 6), o parasito se diferencia em fases distintas de desenvolvimento à medida que migra a partir do intestino posterior. Alterações morfológicas e funcionais ocorrem nessas fases assegurando a sobrevivência do parasito (KAMHAWI, 2006). Dentro da MP as formas amastigotas dão origem a formas promastigotas procíclicas, as quais têm tamanho pequeno e flagelo curto. Essa forma é a primeira forma de desenvolvimento do ciclo de vetor. As promastigotas procíclicas se desenvolvem em formas nectomonadas, cujas funções principais são o escape da MP, o ancoramento em células epiteliais que revestem o intestino médio e a migração para a parte anterior do intestino do inseto. As formas nectomonadas dão origem às formas leptomonadas. Essas formas se dividem e geram uma intensa infecção no intestino anterior do vetor (GOSSAGE et al., 2003; BATES; ROGERS, 2004).

Nos últimos estágios de desenvolvimento encontram-se as formas haptomonadas, cuja forma precursora ainda não é bem esclarecida (nectomonadas ou leptomonadas), e as formas metacíclicas, originadas das formas leptomonadas. A forma metacíclica é característica por apresentar corpo pequeno e flagelo alongado, o que favorece sua movimentação. É a forma responsável pela infecção no hospedeiro vertebrado. Esse processo de transformação que envolve transformações bioquímicas e morfológicas durante a evolução de formas promastigotas avirulentas em promastigotas virulentas denomina-se metaciclogênese. O tempo aproximado necessário para que os parasitos completem seu desenvolvimento no vetor é de 6-9 dias (GOSSAGE et al., 2003; KAMHAWI, 2006).

Figura 6- Ciclo de vida de *Leishmania* em um vetor competente.

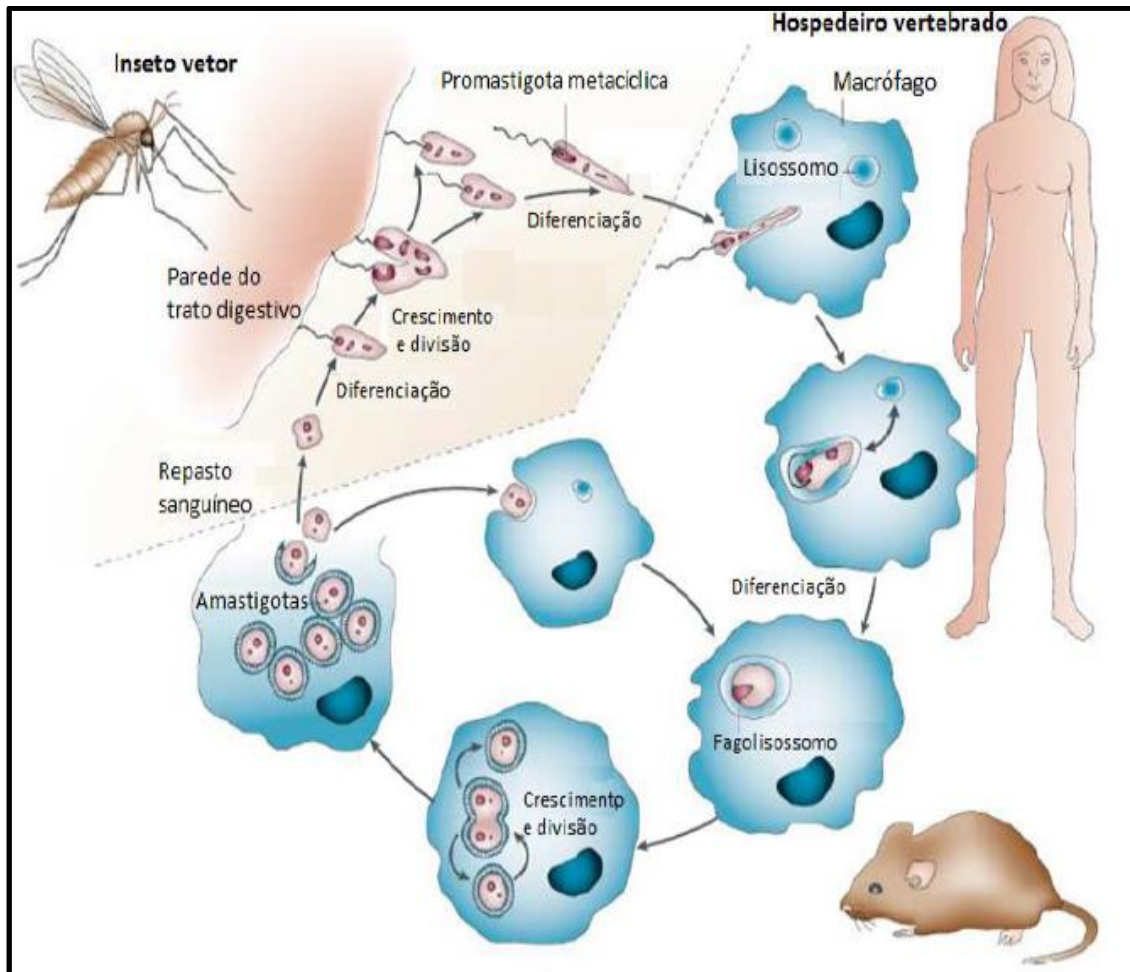
Fonte: Adaptado de KAMHAWI, 2006.

O ciclo de vida infectivo (Figura 7) promovido pelo protozoário do gênero *Leishmania* no hospedeiro vertebrado inicia-se quando o flebótomo infectado alimenta-se do sangue desse mamífero no momento do repasto sanguíneo. Nesse processo, o aparelho bucal do inseto produz um pequeno hematoma de sangue através do qual se alimenta e também introduz as formas promastigotas metacíclicas (VANNIER-SANTOS et al., 2002). A saliva do vetor tem um papel biologicamente ativo na infecção, afetando diretamente a hemostasia, respostas inflamatórias e imunológicas do hospedeiro (ANDRADE et al., 2007; MOUGNEAU et al., 2011). A transmissão das formas promastigotas de *Leishmania* ocorre por intermédio das fêmeas dos flebotomíneos, logo o repasto sanguíneo no hospedeiro favorece o amadurecimento e postura dos ovos pelas fêmeas (BATES; ROGERS, 2004).

Em resposta a agressão causada pelo repasto sanguíneo do inseto, as células de defesas do hospedeiro montam um mecanismo de defesa que consiste na fagocitose do parasita por células fagocíticas do sistema imunológico, principalmente neutrófilos polimorfonucleares e macrófagos (SILVEIRA et al., 2009). Tanto neutrófilos como macrófagos são capazes de fagocitar as células de *Leishmania*, mas, apenas o macrófago possui as condições necessárias para a sobrevivência do parasita e sua diferenciação. O macrófago possui o vacúolo parasitóforo, compartimento intracelular ácido com proteases e hidrolases, no qual ocorre a diferenciação da forma promastigota na forma amastigota não flagelada e a *Leishmania* encontra condições favoráveis para sua

multiplicação por divisão binária. Após se multiplicarem dentro dos vacúolos parasitóforos, as amastigotas provocam a lise da célula hospedeira, assim, as formas amastigotas liberadas na corrente sanguínea são fagocitadas por outros macrófagos, iniciando uma reação inflamatória no local, fechando assim o ciclo de vida desses parasitos no hospedeiro vertebrado (BURCHMORE; BARRETT, 2001).

Figura 7 – Ciclo de vida de *Leishmania*.



Fonte: modificado de SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002.

1.3 Resposta imunológica na infecção por *Leishmania* sp.

A resposta imunológica desempenhada pelo hospedeiro ao entrar em contato com o parasito tem um papel fundamental no desenvolvimento ou não da doença clínica. Tanto a resposta imune humoral quanto a celular ocorrem durante a infecção por *Leishmania*. A cura da doença está relacionada à resposta imune celular, pois essa resposta é capaz de ativar os macrófagos do hospedeiro e eliminar o parasito. Embora as infecções por *Leishmania* induzam uma forte resposta humoral, os anticorpos parecem não desempenhar papel na proteção (AWASTHI et al., 2004; TRIPATHI et al., 2007).

A formação de um ferimento microvascular em decorrência da picada do flebotomíneo permite a inoculação de formas promastigotas metacíclicas no hospedeiro mamífero, iniciando uma forte resposta inflamatória local (MOGNEAU et al., 2011). Foi demonstrado que formas promastigotas de *Leishmania* induzem a migração de neutrófilos, através da liberação do fator quimiotático de *Leishmania* (LCF) com potente atividade quimiotática para neutrófilos, mas não para outros leucócitos, tais como monócitos ou células *natural killers* (NK) (VAN ZANDBERGEN et al., 2002; LASKAY et al., 2003; AWASTHI et al., 2004; RITTER et al., 2009). A migração de neutrófilos ocorre poucas horas após a inoculação das formas promastigotas, enquanto que um número significativo de macrófagos migra para o local da infecção após 2 a 3 dias (LASKAY et al., 2003).

Em modelo de infecção com *L. major* observou-se que os neutrófilos possuem a capacidade de fagocitar esses parasitos. Contudo, dentro dos neutrófilos os parasitos não se multiplicam e mantêm-se sob a forma promastigota (LASKAY et al., 2003; RITTER et al., 2009). Neutrófilos infectados com *Leishmania* têm sua apoptose espontânea retardada (AGA et al., 2002) e liberam a quimiocina proteína inflamatória macrofágica-1 β (MIP-1 β), que exerce atividade quimiotática para macrófagos (MENTEN et al., 2002; LASKAY et al., 2003), resultando na migração desses fagócitos para o sítio de infecção. Os macrófagos fagocitam os neutrófilos parasitados e neles os parasitos não só sobrevivem, mas também se multiplicam, sendo os macrófagos as células hospedeiras finais de *Leishmania* (LASKAY et al., 2003; JOCHIM; TEIXEIRA, 2009).

A infecção em modelo murino por *Leishmania major* há mais de 20 anos tem sido associada com o desenvolvimento de respostas imunes dominadas T-helper 1 (Th1)

e T-helper 2 (Th2) (MOUGNEAU et al., 2011). As células T desempenham um papel crucial na infecção por *Leishmania*. Estudos com camundongos isogênicos infectados com *L. major* demonstraram que a resistência e a suscetibilidade à leishmaniose estão relacionadas com o tipo de resposta desempenhada pelas células T CD4⁺ (SACKS; ANDERSON, 2004; GUMY et al., 2004; LAOUAR et al., 2005; SILVEIRA et al. 2009). Camundongos BALB/c infectados com *L. major* são suscetíveis por apresentarem lesões progressivas e alta carga parasitária no local da infecção, com desenvolvimento do perfil Th2. Por outro lado, quando utilizados linhagens de camundongos do tipo C57BL/6 ou C3H, ocorre cura espontânea, com poucos parasitas presentes no local da inoculação e desenvolvimento do perfil Th1 (LOCKSLEY et al., 1987; SCOTT et al., 1988; GUMY et al., 2004).

As células Dendríticas (CD) representam um grupo de fagócitos mononucleares provenientes da medula óssea, responsáveis por transportar antígenos de *Leishmania* do local da infecção para o linfonodo mais próximo. Elas processam e apresentam os antígenos para as células T CD4⁺ virgens (Th0), que então se diferenciam nas células efectoras T CD4⁺, Th1 ou Th2, associadas aos fenótipos de resistência e susceptibilidade, respectivamente (SOONG, 2008; SILVEIRA et al., 2009).

A diferenciação desses linfócitos TCD4⁺ depende principalmente das citocinas presentes no início da diferenciação, na qual a presença de interleucina (IL)-12, produzida por CD e macrófagos, e de interferon (IFN)- γ , produzidas sobretudo por células NK, induzem a diferenciação de um perfil Th1, enquanto que, principalmente IL-4, induz diferenciação de linfócitos Th-2 (TRIPATHI et al., 2007; MOUGNEAU et al., 2011). Esse tipo de resposta foi polarizado em dois tipos distintos, a resposta Th1, envolvida com a resistência à infecção e a resposta Th2, envolvida com a suscetibilidade, sendo distinguidas pelo padrão de citocinas que produzem em consequência da sua estimulação (GUMY et al., 2004; LOUAR et al., 2005; SILVEIRA et al. 2009). No fenótipo do tipo Th1, as principais citocinas produzidas são IL-12, IL-2, fator de necrose tumoral α (TNF- α) e INF- γ , as quais vão promover a ativação de macrófagos e, por conseguinte, a eliminação do parasito. No entanto, no tipo de resposta Th2, as principais citocinas produzidas são IL-4, IL-6, IL-10, que irão inibir a ativação de macrófagos, contribuindo para a sobrevivência do parasito (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002; SILVEIRA et al. 2009). A ativação dos macrófagos é

considerada o principal mecanismo de eliminação do parasito. O IFN- γ é responsável por aumentar a síntese da enzima sintase óxido nítrico induzida (iNOS) que conduz à produção, dependente de L-arginina, de espécies reativas de nitrogênio e oxigênio tóxicos para o parasita (MAÜEL et al., 1991; GUMY et al., 2004). O papel do INF- γ em que confere resistência à infecção com *L. major* foi demonstrado em camundongos deficientes em INF- γ ou no receptor de INF- γ que foram incapazes de controlar o crescimento do parasito (SWIHART et al., 1995; GUMY et al., 2004).

No fenótipo do tipo Th2, a principal citocina envolvida na sua diferenciação é a IL-4, outras citocinas como IL-10, IL-13 e fator transformador do crescimento β (TGF- β) também estão envolvidas nesse tipo de resposta e irão inibir a ativação de macrófagos e contribuir pra sobrevivência do parasito (SILVEIRA et al., 2009). As citocinas produzidas durante a resposta Th2 inibem a resposta Th1, como por exemplo, o TGF β suprime a produção de IFN- γ produzido pelas NK, sendo esse necessário para o estabelecimento da resposta Th1. Alternativamente, o TGF β também possui um efeito indireto através da inibição da produção de IL-12 por DC's, o que pode acarretar o desligamento da função das células NK (LAOUAR et al., 2005).

Modelos murinos com camundongos isogênicos BALB/c, C57BL/6 e C57BL/10 e C3H infectados com *L. amazonensis* têm sido descritos por apresentar suscetibilidade à infecção por esse parasito (JONES et al., 2002; CUPOLILO et al., 2003). Enquanto camundongos C57BL/10 e C57BL/6 conseguem curar a infecção por *L. major*, esses camundongos não conseguem curar a infecção produzida por *L. amazonensis*. Nesse modelo de infecção ocorre pouca ou nenhuma produção de IFN- γ , bem como de TNF- α , que estão associados à resistência à infecção (AFONSO, SCOTT, 1993; MAIOLI et al., 2004). Por outro lado a infecção por *L. amazonensis* produziu IL-4 nas primeiras semanas de infecção, porém na fase mais tardia da infecção, quando as lesões eram evidentes, não foi observado níveis de IL-4. (AFONSO, SCOTT, 1993). Essas lesões se desenvolvem mesmo na ausência de IL-4, logo essa suscetibilidade pode não estar associada a uma resposta do tipo Th2. Estudos com camundongos “knockout” sugerem que a IL-10, mas não IL-4, contribui em parte com a suscetibilidade observada para camundongos infectados com *L. amazonensis* (JI et al., 2003). A expressão da citocina IL-10 pode explicar a falta de expressão de IL-12 e consequentemente uma deficiência na imunidade protetora mediada por células no hospedeiro (JONES et al., 2002).

Adicionalmente foi observado em camundongos selvagens C57BL/6 infectados com *L. amazonensis* um retardo na expressão das citocinas inflamatórias IL-12 e IFN- γ , quimiocinas e receptores de quimiocinas. Porém, quando camundongos “knockout” para IL-10 foram infectados com *L. amazonensis*, embora com a permanência das lesões, foi detectado um aumento de 3 a 10 vezes nos níveis de IL-12 e INF- γ após 2 a 4 semanas de infecção quando comparados com camundongos selvagens (JI et al., 2003).

1.4 Tratamento das Leishmanioses

O tratamento das leishmanioses iniciou-se com o uso dos antimoniais trivalentes em 1913. Apenas na década de 1940 os derivados pentavalentes foram introduzidos na terapêutica das leishmanioses e até hoje são consideradas as drogas de primeira escolha no tratamento dessas enfermidades (BRASIL, 2006; TIUMAN et al., 2011). Desde então, a terapêutica para as leishmanioses está baseada principalmente no uso de antimoniais pentavalentes (Sb^V), sendo o antimoniato de N-metil glucamina ou antimoniato de meglumina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio ou gluconato de antimônio (V) sódico (Pentostan®) as drogas de referência tanto no tratamento da LV quanto da LT. Porém, no Brasil, o Pentostan® não é utilizado (RATH et al., 2003; BRASIL, 2007).

Para o tratamento das leishmanioses no Brasil o Glucantime® é a droga de escolha e sua dose recomendada para LC varia entre 10 e 20 mg/ Sb^V /kg/dia durante 20 dias; para tratamento das lesões mucosas recomenda-se 20 mg/ Sb^V /Kg/dia durante 30 dias seguidos (BRASIL, 2007). Para o tratamento da LV recomenda-se o uso de 20 mg/ Sb^V /Kg/dia com aplicação endovenosa ou intramuscular no período de 20 a 40 dias (BRASIL, 2006).

Mesmo após décadas de uso dos antimoniais pentavalentes o mecanismo dos antimoniais não é totalmente compreendido. Sabe-se que os Sb^V são pró-drogas que são reduzidos para as formas trivalentes Sb^{III} , mais tóxicas, principalmente para as formas amastigotas intracelulares. Estudos sugerem que Sb^V atuem em formas amastigotas através de perturbação do metabolismo energético devido à inibição da glicólise e β -oxidação (BERMAN et al., 1987; CROFT et al., 2006). Mais recentemente

tem-se relatado apoptose em formas amastigotas tratadas com formas trivalentes dos antimoniais $Sb^{(III)}$ envolvendo a fragmentação do DNA e a externalização de fosfatidilserina na superfície externa da membrana plasmática (SERENO et al., 2001; CROFT et al., 2006). Para ser ativa, a droga deve penetrar na célula hospedeira, cruzar a membrana fagolisossomal e atuar contra as formas amastigotas intracelulares (OUELLETTE et al., 2004).

Estudos sugerem que a redução do $Sb^{(V)}$ em $Sb^{(III)}$ ocorre mais provavelmente nos macrófagos parasitados do que no interior dos parasitos (ROBERTS; RAINEY, 1993; SERENO et al., 1998; OUELLETTE et al., 2004). Contudo, o local (amastigota ou macrófago) e o mecanismo de redução (enzimático ou não enzimático) dos antimoniais pentavalentes ainda permanecem controversos (CROFT et al., 2006). Os principais efeitos adversos do $Sb^{(V)}$ são decorrentes de sua ação sobre o sistema cardiovascular, sendo também descritos outros efeitos, como insuficiência renal, icterícia, elevação das enzimas hepáticas, hepatotoxicidade e pancreatite, dentre outras complicações (OLIVEIRA et al., 2011).

Não havendo resposta satisfatória ao tratamento das leishmanioses utilizando os antimoniais pentavalentes, a Anfotericina B[®] é utilizada como droga de segunda escolha empregada nessa terapêutica (TIUMAN et al., 2011). A Anfotericina B[®] (AmB) é um antibiótico antifúngico poliênico considerada uma droga de referência utilizada no tratamento de infecções fúngicas sistêmicas (OULLETE et al., 2004). Seu mecanismo de ação envolve a interação com determinados esteróis de membrana plasmática das células fúngicas. Uma vez que as membranas de *Leishmania* contêm ergosterol, a AmB age alterando a permeabilidade celular dos parasitos, levando a morte celular. Apresenta efeito notável contra células de *Leishmania*, logo, seu uso foi estendido para quimioterapia das leishmanioses como uma segunda linha de tratamento, embora apresente também sérios efeitos colaterais. A toxicidade dessa droga provavelmente está relacionada com a semelhança entre o ergosterol de membrana da *Leishmania* e colesterol de células de mamíferos, limitando seu uso na prática clínica (OULLETE et al., 2004; ORDÓÑEZ-GUTIÉRREZ et al., 2007). Com o intuito de se reduzir a toxicidade apresentada pela AmB, novas associações dessa droga à 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 (OULLETE et al., 2004; CROFT et al., 2006).

A Pentamidina é uma diamina aromática que tem atividade no tratamento da leishmaniose visceral (OULLETE et al., 2004). Essa droga entra nas células de *Leishmania* através de um processo mediado por transportadores de diamina de alta afinidade e tem como principal alvo a mitocôndria. O mecanismo de ação da Pentamidina está relacionado com a sua ligação ao DNA e desintegração do mesmo (COELHO et al., 2008). Jean-moreno e colaboradores (2006) demonstraram o seu envolvimento com a inibição da topoisomerase I, associada a replicação do DNA mitocondrial. Outros estudos demonstraram que em *L. mexicana* e *L. donovani* suscetíveis à Pentamidina foi observado acúmulo dessa droga na mitocôndria, enquanto que em parasitos resistentes à Pentamidina foi observado diminuição da acumulação da droga na mitocôndria e restos da droga presentes no citosol (BASSELIN et al., 2002; MUKHERJEE et al., 2006). A alta toxicidade dessa droga é um fator limitante para seu uso. Alguns efeitos como hipoglicemia, hipotensão, alterações cardíológicas, nefrotoxicidade, náuseas, vômitos, dor de cabeça, fadiga e até mesmo morte repentina foram descritas (OLIVEIRA et al., 2011).

A Miltefosina, registrada como Impavido[®], uma hexadecilfosfocolina desenvolvida inicialmente como um agente antitumoral, tem sido utilizada no tratamento da leishmaniose visceral (OULETTE et al., 2004; PÉREZ-VICTORIA et al., 2006). Diferentemente dos demais tratamentos, a Miltefosina é oralmente administrada (PARIS et al., 2004). O mecanismo de ação da Miltefosina não é precisamente conhecido, porém está associada com a biossíntese de fosfolipídios e no metabolismo dos alquil-lipídios (LUX et al., 2000). Estudos demonstraram que a Miltefosina poderia induzir apoptose em formas promastigotas de *L. donovani*. Em todas as doses toleradas testadas, essa droga produziu excelentes resultados de cura parasitológica contra *L. donovani* (OULETTE et al., 2004; PARIS et al., 2004). A eficácia da Miltefosina em modelo murino contra espécies de *L. amazonensis* em leishmaniose tegumentar também tem sido descrita (GODINHO et al., 2012). Pode ser considerada menos severa do que as outras drogas, no entanto, apresenta efeitos colaterais importantes, tais como distúrbios gastrointestinais (OULETTE et al., 2004), além de exibir potencial teratogenicidade, portanto não deve ser administrada em mulheres grávidas (SUNDAR;

OLLIARO, 2007; TIUMAN et al., 2011). Seu uso também tem sido associado ao desenvolvimento de resistência que está diretamente relacionada com a diminuição da acumulação da droga nas células parasitadas (PÉREZ-VICTORIA et al., 2006).

Nesse contexto, no qual os tratamentos apresentam uma toxicidade significativa e efeitos colaterais importantes, destaca-se a importância na busca de novos fármacos para o tratamento das leishmanioses.

1.5 Produtos naturais e substâncias isoladas

A utilização de plantas medicinais como recurso terapêutico é fortemente observada na medicina popular. Essa prática tem contribuído significativamente para a utilização não só de plantas medicinais, como também de medicamentos fitoterápicos (EXTENSIO, 2005). Os produtos naturais constituem uma importante fonte de novas moléculas, as quais, quando isoladas, podem ser investigadas quanto a possuírem potenciais efeitos terapêuticos. Diversas classes de substâncias isoladas têm sido utilizadas como fármacos ativos no tratamento de doenças. Por exemplo, os alcaloides da *Vinca*, Vinblastina e Vincristina, utilizados hoje na quimioterapia do câncer (HIMES, et al., 1976; CHAGALUKA et al., 2014). Essas classes de substâncias também podem servir de base para derivação de novas drogas, como exemplo tem-se o etoposídeo, um medicamento antitumoral, derivado glicosídico semissintético da lignana Podofilotoxina (ARNOLD; WHITEHOUSE, 1981; CHAGALUKA et al., 2014).

O Brasil possui uma das maiores biodiversidades do planeta, existindo inúmeras plantas e/ou produtos derivados das mesmas que possuem efeito profilático ou terapêutico. Uma grande diversidade química é encontrada em várias espécies de plantas, animais e microrganismos. Compostos derivados de plantas têm sido empregados em diversas áreas, com ênfase na terapia do câncer, e esse sucesso justifica a pesquisa desses produtos em diferentes abordagens (RIBEIRO et al., 2012). Substâncias isoladas de plantas também foram identificadas por possuir atividade contra *Leishmania* sp. (KAYSER et al. 2003; MONTE NETO, 2007; CHOWDHURY et al.,

2012). Diante disso, a busca de novas substâncias bioativas com atividade antileishmania não é uma exceção.

A espécie *Hyptis macrostachys*, popularmente conhecida como alfavaca brava ou hortelã do mato, pertence à família Lamiaceae que possui 295 gêneros e cerca de 7.775 espécies com distribuição cosmopolita. Estima-se que 22 gêneros e 402 espécies ocorrem no Brasil. O gênero *Hyptis* Jacq. (Lamiaceae) possui cerca de 300 espécies, com ampla distribuição, ocorrendo principalmente nas regiões tropicais das Américas e África. No Nordeste do Brasil, *Hyptis pectinatae* e *Hyptis suaveolens* são empregadas na medicina popular e comercializadas pelos raizeiros e vendedores de plantas medicinais nas feiras livres da região (BASÍLIO et al., 2006; AGRA et al., 2007). As espécies pertencentes ao gênero *Hyptis* são usadas extensivamente na etnofarmacologia, isso ocorre, devido a sua atividade antimicrobiana, antifúngica, citotóxica, anti-inflamatória, inseticida e anticancerígena (MCNEIL et al., 2011). Possuem uma grande diversidade de compostos, tais como lignanas, terpenoides, flavonoides e esteroides (FALCÃO, MENEZES, 2003).

Extratos de espécies do gênero *Hyptis*, como por exemplo, *Hyptis lacustres* são largamente utilizados na etnofarmacologia, como exemplo, povos ameríndios no Peru utilizam o extrato da planta no combate à leishmaniose cutânea (CÉLINE et al., 2009). Dentre as espécies do gênero *Hyptis* a espécie *Hyptis macrostachys* Benth. é encontrada no semiárido nordestino do Brasil, o que facilita o estudo desta espécie para os pesquisadores dessa região, devido a localização geográfica acessível. *Hyptis macrostachys* é usada popularmente no tratamento da asma, tosse e bronquite. Comumente para esses fins, utiliza-se a folha para realização do infuso, forma predominantemente utilizada na etnofarmacologia (AGRA et al., 2007). O estudo fitoquímico das folhas de *H. macrostachys* resultou no isolamento de dois diterpenos, sendo um deles um novo produto natural. Esses resultados contribuem para a quimiotaxonomia do gênero *Hyptis*, em especial a espécie *H. macrostachys* (COSTA et al. 2010). Recentemente, outro composto foi isolado dessa espécie de planta, uma α -pirona denominada Hiptenolideo, que apresenta atividade espasmolítica quando testada em íleo de cobaia (COSTA et al., 2014).

Duas γ -pironas isoladas de *Podolepsis hieracioides* demonstraram a capacidade de inibir o crescimento de formas promastigotas de *L. donovani*, *L. major*, *L. infantum* e *L. enriettii* e formas amastigotas *L. donovani* (KAYSER et al. 2003). Considerando as potencialidades de *H. macrostachys* bem como do Hiptenolideo, torna-se oportuno ampliar a investigação da atividade biológica dessas substâncias sobre *Leishmania sp.*

O gênero *Phyllanthus* é o maior da família Phyllanthaceae, destaca-se pelo elevado número de espécies dispersas por todas as regiões do mundo, e pela complexidade taxonômica. Esse gênero compreende cerca de 800 espécies, com distribuição em diversos ambientes e tipos de vegetações nas regiões tropicais do mundo. No Brasil, está representado por mais de 100 espécies, amplamente distribuídas em diferentes ambientes (SILVA; SALES, 2007). Espécies desse gênero têm sido conhecidas por apresentarem importantes atividades biológicas, dentre elas atividade anticâncer. Jeena e colaboradores (1990) relataram que o extrato de *Phyllanthus amarus* protege o fígado de hepatocarcinoma induzido por N-nitrosodietilamina de maneira dose dependente em modelos animais. O extrato aquoso da espécie *Phyllanthus urinaria* é conhecido por induzir apoptose de células cancerígenas demonstrada pela fragmentação do DNA e aumento da atividade da caspase 3 (HUANG et al., 2010). *Phyllanthus niruri*, planta utilizada na medicina tradicional da América Latina, possui atividade anti-hiperglicêmica, atividade relacionada à presença de enzimas relevantes para hiperglicemia (RANILLA et al., 2010).

A espécie *Phyllanthus acuminatus*, estudada neste trabalho, tem sido descrita por diversas atividades biológicas. Dentre elas, atividade antifúngica contra fungos de diferentes espécies, tais como *Pythium ultimum* e *Rhizoctonia solani* relacionado ao extrato metanólico e diclorometânico de suas folhas (GOUN et al., 2003), e antimalárica, relacionado ao extrato aquoso de ramos secos (MUÑOZ et al., 2000). A Philantostatin, isolada de Raízes de *Phyllanthus acuminatus* tem sido associada à inibição do crescimento de linhagem leucêmica celular linfocítica (P-388) e linhagem de melanoma murino (B-16) (PETTIT et al., 1982; PETTIT et al., 1990).

A lignana Justicidina B tem sido isolada a partir do extrato etanólico de partes aéreas de *Phyllanthus acuminatus*. As lignanas são uma classe de substâncias isoladas de plantas. Esse termo foi criado por Haworth em 1936 para descrever uma classe de

micromoléculas formadas exclusivamente ou adicionalmente a outros grupos, pelo grupo fenilpropânico (C6-C3)_n, sendo n restrito a poucas unidades (DAR; ARUMUGAM, 2013). Caracterizam uma família de produtos naturais com importantes efeitos biológicos, e sua biossíntese envolve metabólitos primários da via do chiquimato. São derivadas da condensação entre álcoois cinâmicos entre si ou com ácido cinâmico, desempenham função aleloquímica nas plantas e ação farmacológica no homem (GOTTLEB, YOSHIDA, 1984). Dentre as ações farmacológicas dessa classe, a atividade antiviral e antineoplásica foram relatadas. A podofilotoxina, uma lignana isolada da *Podophyllum emodi* (HARWORTH, 1942), e seus derivados semissintéticos são usados na terapia anticâncer (GORDALIZA et al., 2000). Estudos recentes demonstram que as lignanas também possuem atividade antileishmania. A Lignana Nirantina isolada de *Phyllanthus amarus* (Phyllanteaceae) demonstrou atividade antileishmania pela produção de eventos apoptóticos em *Leishmania donovani* (CHOWDHURY et al., 2012). A Iagambina, uma lignana isolada da *Ocotea duckei* se mostrou efetiva contra formas promastigotas de *Leishmania chagasi* e *Leishmania amazonensis* (MONTE NETO et al., 2007).

Com base na forma em que o oxigênio está incorporado no esqueleto e o padrão de ciclização, as lignanas são classificados em oito subgrupos, que são: furofurano, furano, dibenzilbutano, dibenzilbutirolactona, ariltetralina, arilnaftaleno, dibenzociclooctadieno e dibenzilbutirolactol (DAR; ARUMUGAM, 2013). A lignana Justicidina B pertence ao subgrupo arilnaftaleno e ocorre em diferentes gêneros de plantas, porém, foi isolada primeiramente por Munakata e colaboradores (1967) a partir do *Justicia hayatai*. Diferentes e importantes atividades farmacológicas têm sido relatadas para Justicidina B, como por exemplo, efeitos citotóxicos em diferentes linhagens de células neoplásicas, atividade antiviral, inibição da absorção óssea e propriedades antiplaquetárias e antitumorais (ASANO et al., 1996; GERTSCH et al., 2003; LUO et al., 2014). Justicidina B, isolada a partir de *Phyllanthus piscatorum*, apresentou uma forte atividade contra formas tripomastigotas de *Trypanosoma brucei* (CI₅₀ = 0,2 µg / mL) e atividade moderada contra *Trypanosoma cruzi* (CI₅₀ = 2,6 µg / mL). Piscatorin, um derivado de Justicidina B hidroxilado no carbono 09, exibiu uma inibição menor contra *Trypanosoma brucei* e *Trypanosoma cruzi*, com valores de CI₅₀ de 2,3 e >4 µg/ml, respectivamente (GERTSCH et al., 2003; SCHMIDT et al., 2012).

O isolamento da Justicidina B a partir dessa espécie proporciona mais uma alternativa para sua obtenção e favorece a investigação de sua atividade. Até o momento, não existem relatos na literatura de estudos sobre uma possível atividade antileishmania do extrato de *Phyllanthus acuminatus* nem tampouco da lignana Justicidina B, o que a torna, de acordo com as premissas apresentadas, uma molécula promissora nessa investigação.

2 OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Avaliar a potencialidade antileishmania de substâncias obtidas de *Phyllanthus acuminatus* e *Hyptis macrostachys*.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a atividade antipromastigota do extrato etanólico e da lignana Justicidina B obtidas de *Phyllanthus acuminatus* e do extrato etanólico (EtOH), fase diclorometano (DCM) e uma nova pirona isolada de *Hyptis macrostachys*, frente à *Leishmania amazonensis*;
- Avaliar a citotoxicidade das amostras em estudo frente a macrófagos peritoneais de camundongos suíços;
- Avaliar a atividade antiamastigota da lignana Justicidina B isolada de *Phyllanthus acuminatus* sobre macrófagos murinos infectados *in vitro* com *Leishmania amazonensis*;
- Investigar a atividade imunomoduladora da lignana Justicidina B isolada de *Phyllanthus acuminatus* sobre macrófagos murinos infectados *in vitro* com *Leishmania amazonensis*;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção das substâncias avaliadas

3.1.1 Obtenção do Extrato EtOH de *Phyllanthus acuminatus* e da lignana Justicidina B.

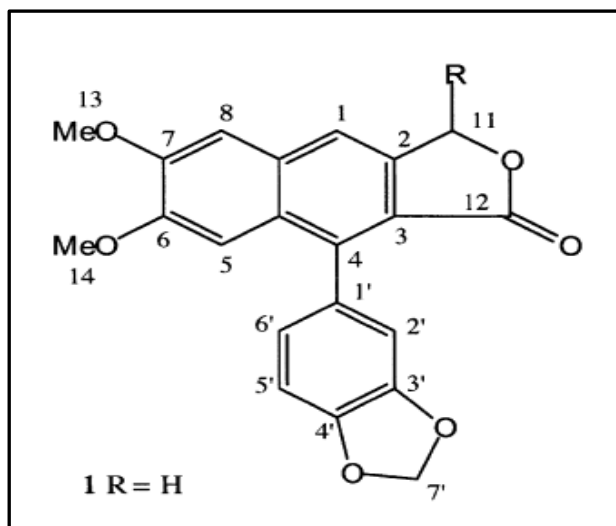
O extrato EtOH de *Phyllanthus acuminatus* e a lignana Justicidina B foram obtidos e cedidos pelos professores Dr. Josean Fachine Tavares e Dr. Marcelo Sobral da Silva. Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba.

Para a obtenção do extrato etanólico e lignana Justicidina B (Figura 8) o material botânico foi dessecado em estufa de ar circulante à temperatura de 40°C durante 72 horas, em seguida, triturado e moído em moinho mecânico. O pó obtido foi submetido à maceração com etanol 96% por três dias e o processo repetido mais duas (02) vezes para completo esgotamento do material vegetal. A solução extrativa foi concentrada em rotaevaporador sob pressão reduzida à temperatura de 40° C obtendo-se o extrato bruto ou extrato etanólico, o mesmo foi submetido a uma partição líquido/líquido com hexano, acetato de etila e n-butanol em diferentes proporções.

As frações obtidas com diferentes proporções dos solventes acima citados foram cromatografadas para isolamento dos constituintes em Cromatografia em Coluna (CC) tendo como fase fixa sílica gel ou sephadex, Cromatografia de Média Pressão, Cromatografia em Camada Delgada Preparativa e Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (CLAE). Como fase móvel, foram utilizados solventes orgânicos destilados no próprio laboratório, solventes P.A. ou grau HPLC conforme necessidade da técnica aplicada. As frações obtidas foram monitoradas através da Cromatografia em Camada Delgada Analítica (CCDA) e a visualização das substâncias aplicadas foi realizada sob luz ultravioleta, utilizando reveladores específicos na placa ou pela impregnação das mesmas em cuba de vidro saturada por vapores de iodo.

As substâncias isoladas tiveram suas estruturas determinadas, identificadas ou elucidadas através métodos espectroscópicos, Infravermelho, Ultravioleta, Ressonância Magnética Nuclear de hidrogênio (RMN- ^1H) e de carbono 13 (RMN- ^{13}C) uni e bidimensionais (HMQC, HMBC, COSY E NOESY) e ainda (EM) Espectrometria de Massa (DUARTE, 2013).

Figura 8- Estrutura química da Justicidina B.



Fonte: GERTSCH et al., 2003.

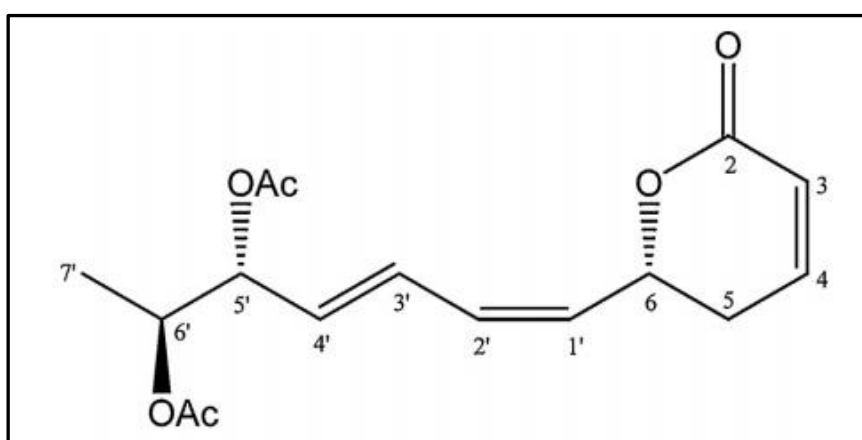
3.1.2 Obtenção do Extrato EtOH, Fase DCM e α -pirona Hiptenolideo de *Hyptis macrostachys*.

O Extrato EtOH, Fase DCM e α -pirona Hiptenolideo de *Hyptis macrostachys* obtidos e cedidos pelos professores Dr. Josean Fechine Tavares e Dr. Marcelo Sobral da Silva. Programa de Pós Graduação em Produtos Naturais e Sintéticos Bioativos da Universidade Federal da Paraíba.

Partes aéreas de *Hyptis macrostachys* foram coletadas no município de Maturéia- PB, semiárido paraibano. O material vegetal foi identificado pela prof^a Dr^a Fátima Agra e uma exsicata encontra-se depositada no Herbário Prof. Lauro Pires Xavier, na Universidade Federal da Paraíba sob identificação AGRA 6947. O material vegetal seco e pulverizado (2kg) foi macerado com etanol (95%). O extrato foi concentrado em rotaevaporador, obtendo-se assim o extrato etanólico bruto (200g), dos quais 100g foi submetido à filtração a vácuo usando um funil poroso e sílica gel, e com os eluentes: hexano, diclorometano e acetato de etila (AcOEt) proporcionando as

respectivas frações 1, 12,3 e 18,7g. A fração diclorometano foi separada por cromatografia em coluna utilizando o hexano, hexano: AcOEt e AcOEt em ordem crescente de polaridade, rendendo 60 frações. Após esse procedimento as frações foram submetidas à cromatografia em camada delgada comparativa (CCDC). A fração 15 foi submetida à filtração em gel de sílica com hexano: AcOEt 1:1, obtendo-se o Hiptenolideo (Figura 9) (COSTA et. al., 2014).

Figura 9- Estrutura química do Hiptenolideo.



Fonte: COSTA et al., 2014

3.2 Preparo das soluções das substâncias avaliadas

Para os testes *in vitro*, as amostras foram pesadas (20mg) e diluídas em 1 mL de dimetilsulfóxido [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, através da diluição da solução estoque no próprio meio de cultura (Schneider ou RPMI 1640). A concentração final de DMSO não ultrapassou 0,5%, concentração essa que não apresentou citotoxicidade para as células utilizadas.

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

As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/IFLA/BR/67/PH8) utilizadas neste trabalho foram cultivadas, *in vitro*, em tubos de ensaio contendo meio de cultura ágar-sangue NNN (Novy-McNeal-Nicolle), associado ao meio líquido Schneider, suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de antibiótico, estreptomicina (100 µg/mL) e penicilina (100 U.I./mL). As células foram incubadas a 26±1°C e repicadas semanalmente para manutenção da viabilidade celular.

Para utilizações futuras, células no início da fase estacionária de crescimento foram criopreservadas. Para isso, adicionou-se lentamente 10% de glicerol estéril sob agitação constante nas culturas de promastigotas em meio Schneider completo, após 15 minutos alíquotas de 1 mL foram distribuídas em tubos apropriados para criopreservação, esses tubos foram mantidos em freezer a -80° e em nitrogênio líquido.

A espécie *L. amazonensis* também foi mantidas *in vivo*, através da inoculação de 1x10⁷ promastigotas/mL, em fase estacionária de crescimento, no coxim plantar da pata posterior de camundongos suíços. Os camundongos utilizados foram provenientes do Biotério Thomas George, localizado no CBiotec/UFPB. Todos os protocolos experimentais que utilizaram animais foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais – CEUA/CBiotec/UFPB com o registro n. 1210/12 (ANEXO).

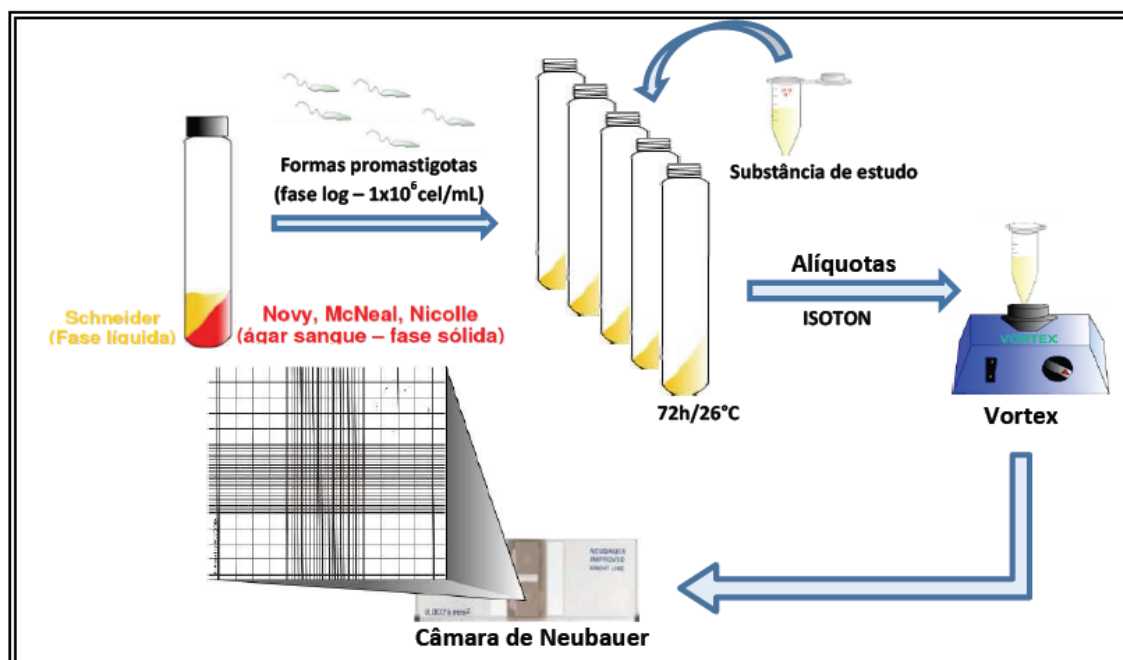
3.4 Avaliação da atividade antipromastigota e determinação da concentração que inibe 50% do crescimento dos parasitos (CI₅₀)

A determinação da inibição do crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* frente às substâncias em estudo foi realizada utilizando tubos de ensaio rosqueados contendo meio líquido Schneider suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF) e 1% de antibiótico [estreptomicina (100 µg/mL) e penicilina (100 U.I./mL)]. Nos tubos de ensaio foram adicionados 1x10⁶ promastigotas/mL de *Leishmania amazonensis* em fase logarítmica de crescimento, na ausência (controle) e presença de diferentes concentrações das substâncias avaliadas.

Após 72 horas de incubação a $26^{\circ}\text{C}\pm 1$, 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) na proporção de 1:10, os quais, foram submetidos a vigorosa agitação em aparelho vortex por aproximadamente dois (2) minutos. As células foram quantificadas e analisadas sob microscopia óptica comum diretamente em câmara de Neubauer (Figura 10). A contagem do número de parasitos/ml de cultura foi realizada utilizando a fórmula: N° de parasitos = média dos quatro (04) quadrantes x inverso da diluição da amostra x 10^4 . Alíquotas das culturas também foram colocadas em lâminas de vidro, cobertas com lamínulas e observadas quanto à morfologia em microscópio óptico.

Ao mesmo tempo as culturas de *Leishmania amazonensis* foram avaliadas quanto à sensibilidade ao Glucantime[®] [300mg/mL (Aventis Pharma, Brasil)] e a Anfotericina B[®] [1mg/mL (Cristália)], utilizadas como drogas de referência. As drogas foram gentilmente cedidas pela Farmácia Hospitalar do Hospital Universitário Lauro Wanderley-UFPB. As drogas foram diluídas em meio Schneider completo, de acordo com as concentrações testadas.

As culturas controles, cujo crescimento foi considerado 100%, foram mantidas na ausência de substâncias e os cálculos da porcentagem de inibição de crescimento das substâncias avaliadas foram calculados em relação à cultura controle.

Figura 10-Experimento de atividade antipromastigota com *Leishmania amazonensis*.

Fonte: Nérís, 2012. Formas promastigotas de *L. amazonensis* em fase logarítmica de crescimento (1×10^6 cel/mL) foram distribuídas em tubos de ensaio contendo 1mL de meio Schneider com diferentes concentrações de todas as amostras testadas. As culturas foram incubadas a $26^\circ\text{C} \pm 1^\circ\text{C}$ por 72h. Posteriormente, alíquotas das culturas foram diluídas em solução ISOTON e quantificadas sob microscopia óptica em câmara de Neubauer.

3.5. Análise de fragmentação de DNA por eletroforese em gel de agarose.

Com o intuito de investigar a atividade antipromastigota da Justicidina B foi realizada uma análise qualitativa da integridade do DNA de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, com a finalidade de observar uma possível fragmentação de DNA, característico de células em apoptose. Para isso, as formas promastigotas de *L. amazonensis* em fase logarítmica de crescimento foram incubadas na ausência (controle negativo) e presença da Justicidina B nas concentrações de 1x, 2x, 4xIC₅₀. Como controle positivo, foi utilizado o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) na concentração de 4mM (DAS et al., 2001). As culturas foram incubadas durante overnight a $26 \pm 1^\circ\text{C}$, e após este período as células foram submetidas à extração de DNA.

A extração de DNA de *Leishmania* foi realizada através do método clorofórmio/fenol (SAMBROOK et al., 1989). Inicialmente, as culturas (1mL) foram centrifugadas a $6610 \times g$ [9000 rpm (Microcentrífuga MCD 2000-HT)] durante 10 minutos, sendo o sobrenadante descartado. Em seguida, adicionou-se 300μL de Tampão

de Lise [Tris HCl 1M pH 8,0 (Invitrogen Co. CA); EDTA 0,5M pH 8,0 (SIGMA® Chemical Co., U.S.A); SDS 10% (SIGMA® Chemical Co., U.S.A) em água miliQ estéril] e 10µL proteoquinase k (SIGMA® Chemical Co., U.S.A) a 20mg/mL. Essa solução foi incubada em banho-maria (Nova Ética- 316D) *overnight* a 37°C. No dia seguinte, adicionou-se 300µL de fenol, os tubos foram submetidos à agitação por 5 minutos e centrifugados a 8161 x g [10000 rpm (Microcentrífuga MCD 2000-HT)] por 5 minutos. A fase aquosa foi transferida para um novo tubo, onde foi adicionado 300µL 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 (Microcentrífuga MCD 2000-HT)] por 2 minutos, sendo a fase aquosa removida para um novo tubo. Esse procedimento foi repetido duas vezes. Por fim, adicionou-se 500µL de etanol gelado (2,5 vezes o volume) e 30µL 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 ressuspensa em 50µL 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 50µL de tampão TE (Tris-HCl 10 mM, pH. 8,0; EDTA 1 mM) e 10µg/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 300µL de etanol gelado e 15µL 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 ressuspensa 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 de *Leishmania amazonensis*, foi estimado por espectrofotômetro (Thermo Scientific NanoDrop 2000). O DNA juntamente com corante GelRed Nucleic Acid Gel Stain 1:500 (10.000x Biotium®) foi aplicado em gel de agarose 1% (Gibco, USA) e a eletroforese foi realizada em tampão TBE (Tris/Borato/EDTA) a 60V, 50mA por 1h30min. Após a eletroforese, os géis foram analisados sob luz ultravioleta utilizando-se um transiluminador de ultravioleta (ImageMaster®).

3.6 Avaliação da citotoxicidade em macrófagos murinos através do corante vital azul de tripan

Para coleta de macrófagos foram utilizados camundongos suíços (*Mus musculus*) com 8 a 10 semanas de idade, provenientes do biotério Thomas George / UFPB. Os camundongos foram elicitados através da inoculação de 10 mL de tioglicolato (Gibco) na cavidade intraperitoneal. Após 5 dias os animais foram eutanasiados por deslocamento cervical e a coleta dos macrófagos foi realizada pela injeção 10 mL de PBS gelado suplementado com 3% de SBF na cavidade peritoneal (Figura 11), sendo essa solução recuperada em seguida e adicionada a tubos de polipropileno. O macrófagos foram submetidos à centrifugação durante 10 minutos a 112 x g [2000 rpm (centrífuga PARSEC CT0603)] e resuspenso em 1 mL de meio RPMI completo [RPMI, 10% SBF, estreptomicina (100µg/mL) e penicilina (100 U/mL)]. Os macrófagos viáveis foram quantificados em câmara hemocitométrica de Neubauer na presença do corante vital azul de Tripan 0,4%, que se acumula apenas em células mortas, permitindo assim, a distinção de células viáveis das não viáveis.

Figura 11- Retirada de lavado peritoneal.

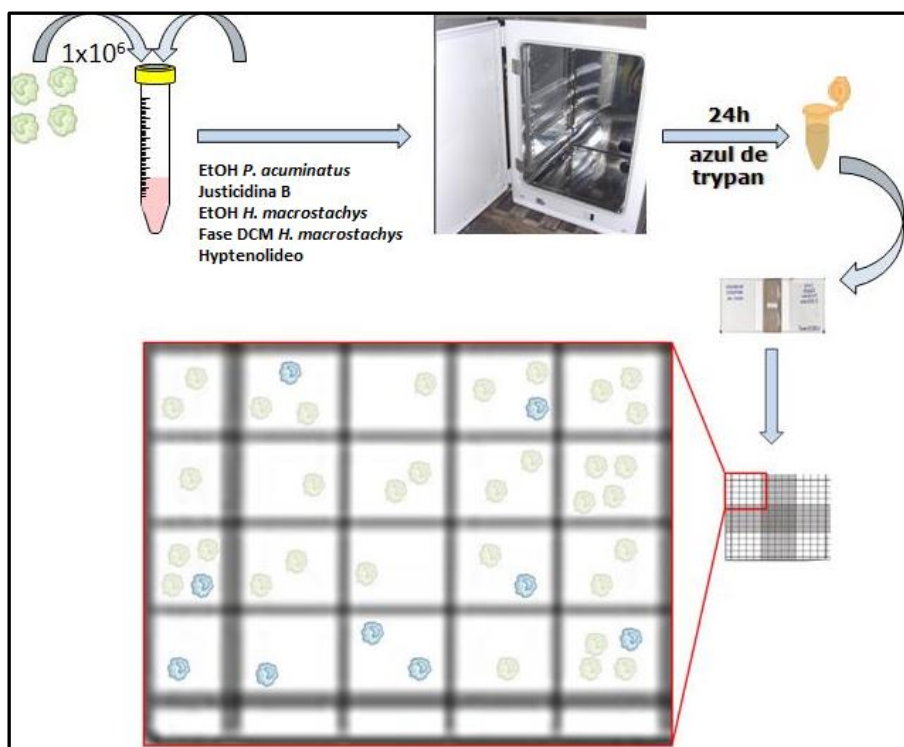


Fonte: DIAS, C.N.S. Foram injetados 10 mL de PBS gelado suplementado com 3% de SBF e em seguida retirado lavado peritoneal.

As células viáveis foram quantificadas em câmara hemocitométrica de Neubauer e o volume ajustado para 1×10^6 células/mL, e então distribuídas em tubos de polipropileno. Em seguida, diferentes concentrações das substâncias testadas foram adicionadas aos tubos. O controle foi feito com células incubadas na ausência das moléculas avaliadas. Os macrófagos foram incubados por 24h em atmosfera de 5% de CO_2 , após esse período foram novamente quantificadas na presença do corante azul de trypan 0,4% (Figura 12).

O número de células por mililitro da amostra foi estimado como a média dos quatro quadrantes $\times$ o inverso da diluição da amostra $\times 10^4 \times 1,1$ (fator de correção da diluição com o azul de tripan). A viabilidade celular foi calculada em porcentagem de células viáveis frente às substâncias testadas em comparação com 100% de viabilidade celular observada no controle.

Figura 12 - Esquema de ensaio de viabilidade celular.



Fonte: Adaptado de CALDAS, 2010.

3.7 Padronização da infecção de macrófagos murinos infectados *in vitro* com formas promastigotas e amastigotas axênicas de *Leishmania amazonensis*

3.7.1 Preparo das formas amastigotas axênicas

Para utilização das formas amastigotas axênicas foi utilizado um repique a partir de isolamento de infecção *in vivo*, não ultrapassando o quinto repique, com inóculo inicial de 1×10^5 promastigotas (MHOM/IFLA/BR/67/PH8) para cada mL em meio Schneider completo (100UI/ml estreptomicina-penicilina +SBF 20%) pH 7,0. As células foram incubadas a 26°C até atingirem a fase estacionária de crescimento (HODGKINSON, et al., 1996).

No quinto dia essas células foram centrifugadas em tubos de polipropileno durante 10 minutos a $112 \times g$ [2000 rpm (centrífuga PARSEC CT0603)], o sobrenadante foi descartado e o precipitado resuspenso em meio Schneider completo (100UI/mL estreptomicina-penicilina +SBF 20%) pH 5,5. Essas células foram incubadas durante 3 dias a uma temperatura de 32°C em uma atmosfera de 5% de CO₂ (HODGKINSON, et al., 1996; CALLAHAN et al., 1997). Após este período as células foram analisadas sob microscopia óptica, quanto ao formato típico de amastigotas.

3.7.2 Preparação de macrófagos peritoneais utilizados na infecção

Para a obtenção dos macrófagos, camundongos foram previamente elicitados com 10 mL de tioglicolato (Gibco) injetados na cavidade intraperitoneal. No quinto dia, os camundongos foram eutanasiados e imersos em álcool 70%. Em seguida, foram abertos pela cavidade abdominal, utilizando instrumentos previamente esterilizados por imersão em álcool absoluto seguido de flambagem, de modo que a cavidade peritoneal ficasse exposta. Em seguida foi injetado na cavidade peritoneal 10mL de PBS gelado suplementado 3% de SBF, sendo essa solução recuperada em seguida e adicionada a tubos de polipropileno. As células foram submetidas à centrifugação durante 10 minutos à $111 \times g$ [1000 rpm (centrífuga PARSEC CT0603)] e resuspensas em 1 ml de meio

RPMI completo [RPMI, 10% SBF, estreptomicina (100µg/mL) e penicilina (100 U/mL)].

Os macrófagos viáveis foram quantificados em câmara de Neubauer na presença do corante vital azul de Tripán 0,4%. O sobrenadante foi retirado e as células foram resuspensas e a elas foi adicionado 1ml de meio RPMI completo, em seguida foi feita uma diluição de 10x, dessa diluição foi retirado 90µL e adicionado 10µL de azul de tripan, esses macrófagos foram quantificados em câmara de Neubauer, a quantidade contada foi multiplicada por 1,1 e pela diluição 10^1 , já que a diluição foi de 10x.

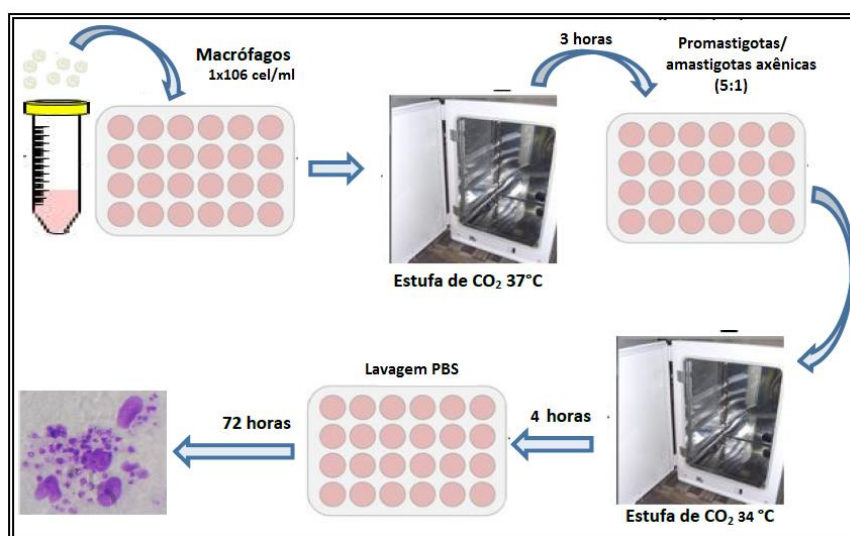
3.7.3 Avaliação da infecção promovida por formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis*

A concentração de 1×10^6 macrófagos/mL foi ajustada com meio RPMI completo, e cada ml dessa suspensão foi adicionado a placas de 24 poços contendo uma lamínula circular estéril em cada poço na qual os macrófagos aderem. Em seguida as placas foram incubadas a 37°C em atmosfera de 5% de CO₂ durante 3 horas para que os macrófagos pudessem aderir na lamínula (Figura 13). Durante esse período as formas promastigotas e amastigotas-axênicas foram centrifugadas por 10 minutos a 447 x g [2000 rpm (Centrífuga Parsec CT0603)]. O sobrenadante foi descartado e o precipitado resuspenso em 1mL de RPMI completo e quantificadas em câmara de Neubauer. Após as 3 horas de incubação dos macrófagos foram inoculadas 5×10^6 (MOI: 5) formas promastigotas em fase estacionária de crescimento ou amastigotas axênicas em seus respectivos poços. Em seguida, as placas foram colocadas em estufa a 34°C durante 4 horas em atmosfera de 5% CO₂.

Após o período de infecção os poços foram lavados 3 vezes com PBS suplementado com 3% de SBF pré-aquecido à 34°C para que as células não aderidas e não internalizadas fossem removidas. Em seguida adicionou-se 1mL de RPMI completo em cada poço e as placas foram recolocadas na estufa a 34°C em atmosfera de 5% de CO₂, durante 72 horas (figura 5).

No tempo determinado as lamínulas foram coradas com o kit de coloração hematológica rápida (Newprov®, Brasil) e montadas em lâminas permanentes com o uso de entelan. A análise das lamínulas foi realizada através de microscopia óptica comum no aumento de 1000x, na qual foram quantificados 300 macrófagos por lamínula, analisando a quantidade de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófago infectado.

Figura 13 – Esquema do ensaio de infecção com formas promastigotas e amastigotas axênicas.



Fonte: Adaptado de NÉRIS, P.L.N. Macrófagos foram incubados em estufa de CO₂ por 3h para aderência e infectados com formas promastigotas e amastigotas axênicas de *L. amazonensis* (MOI:5). Essas células foram coradas 72 horas após a infecção e as lamínulas analisadas sob microscopia óptica comum (100x).

3.8 Avaliação da atividade antiamastigota de Justicidina B

Para avaliação da atividade antiamastigota de Justicidina B foram utilizados macrófagos peritoneais murinos, o procedimento de retirada dos mesmos foi idêntico ao executado no item 3.7.2. Para a infecção foram utilizadas formas promastigotas em fase estacionária de crescimento.

Com descrito no item 3.7.3, os macrófagos aderidos foram infectados com formas promastigotas (MOI: 5). Após o período de infecção os poços foram lavados 3 vezes com PBS suplementado com 3% de SBF pré-aquecido à 34°C para que as células não aderidas e não internalizadas fossem removidas. Em seguida adicionou-se 1ml de

RPMI completo em cada poço, posteriormente adicionou-se Justicidina B ou Glucantime® em diferentes concentrações e as placas foram recolocadas na estufa a 34°C em atmosfera de 5% de CO₂, durante 24 e 72 horas.

Após os dois tempos de tratamento as lamínulas foram coradas com o kit de coloração hematológica rápida (Newprov®, Brasil) e montadas em lâminas permanentes com o uso de entelan. Os sobrenadantes das culturas foram congelados a -20° C para posterior dosagem de citocinas e óxido nítrico (NO). A análise das lamínulas foi realizada através de microscopia óptica comum no aumento de 1000x, na qual foram quantificados 300 macrófagos por lamínula, analisando a quantidade de macrófagos infectados e o número de amastigotas por macrófago infectado.

3.9 Detecção de citocinas através de ensaio imunoenzimático

O sobrenadante dos ensaios de infecção de macrófagos com promastigotas (item 3.8) de *L. amazonensis* foram analisados quanto à presença das citocinas IL-6, IL10 e IL12 de acordo com o protocolo especificado no Kit do fabricante (eBIOSCIENCE®, Inc. Science Center Drive, San Diego, CA-USA).

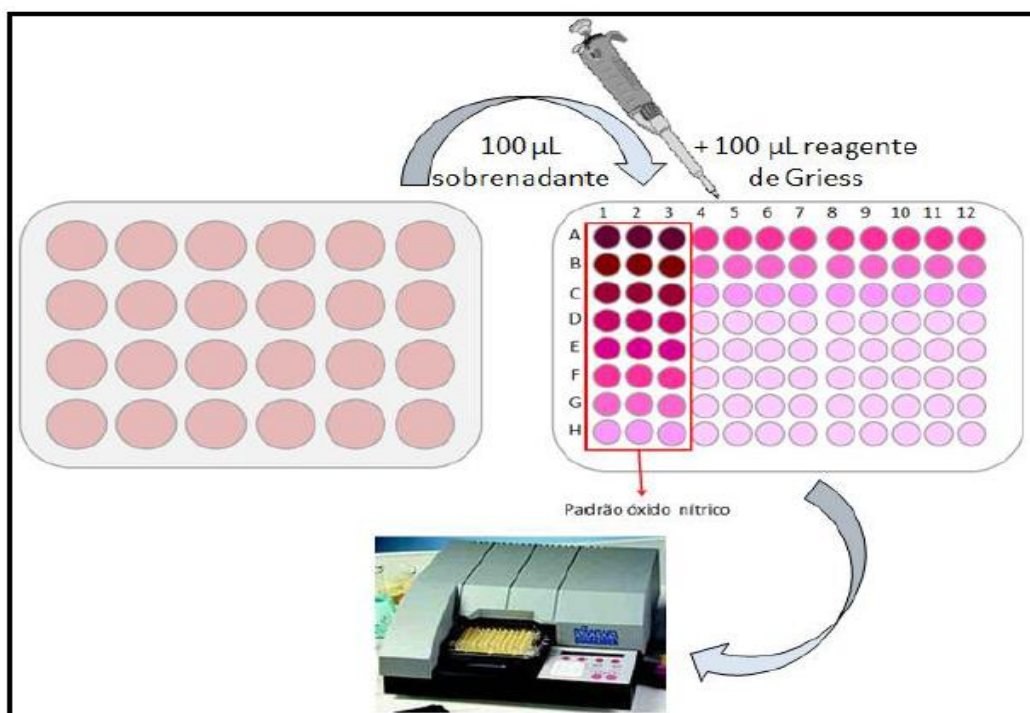
Inicialmente, placas de ELISA (NUNC-Immuno™) foram sensibilizadas com o anticorpo de captura (anti-IL-6, anti-IL10 e anti-IL12) e incubadas por 18 horas a 4°C. Posteriormente, as placas foram lavadas com PBS contendo 0,05% de Tween 20 (SIGMA® Chemical Co., U.S.A) e os sítios inespecíficos foram bloqueados 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 IL-6 (500 pg/mL a 7,55 pg/mL), IL-10 (4000 pg/mL a 31,25 pg/mL) e IL 12 (2000- 15,62 pg/mL) para a realização da curva. As placas foram novamente incubadas por 18 horas a 4°C.

Após este tempo, as placas foram lavadas e o complexo detector, formado pelo anticorpo de detecção biotinilado, foi adicionado às placas, sendo essas, 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 450nm. As quantidades de citocinas foram calculadas a partir das curvas-padrão.

3.10 Determinação dos níveis de óxido nítrico (NO)

Os sobrenadantes dos ensaios de infecção com promastigotas de *L. amazonensis* tratados com Justicidina B (descrito no item 3.8) foram testados quanto à produção de nitrito pela reação de Griess, como uma medida da produção de óxido nítrico (GREEN et al., 1982). Para essa análise, em cada amostra de sobrenadante (100µL) 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 baseando-se em uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO₂) estabelecida através de um padrão de nitrito cuja concentração varia de 1mM 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 (Figura 14).

Figura 14- Esquema da dosagem de NO.

Fonte: Adaptado de CALDAS, 2010. Dosagem da produção de óxido nítrico em sobrenadantes de culturas infectadas com *L. amazonensis* tratadas com Justicidina B.

3.11 Análise estatística

Para os dados obtidos em cada experimento foi utilizado o teste “t-Student” para dois tratamentos, para mais de dois tratamentos foi utilizado o teste de ANOVA com post test Bonferroni. Para realização da análise estatística, foi utilizado o programa GraphPadPrism 5.0. Apenas os valores de $P \leq 0.05$ foram considerados significativos.

Para o cálculo de IC_{50} (concentração capaz de inibir 50% do crescimento), CC_{50} (concentração citotóxica para 50% das células) e EC_{50} (concentração efetiva para diminuir 50% da infecção) foi utilizado o modelo probit de análise de regressão utilizando o programa SPSS 13.0 for Windows.

4 RESULTADOS

4. RESULTADOS

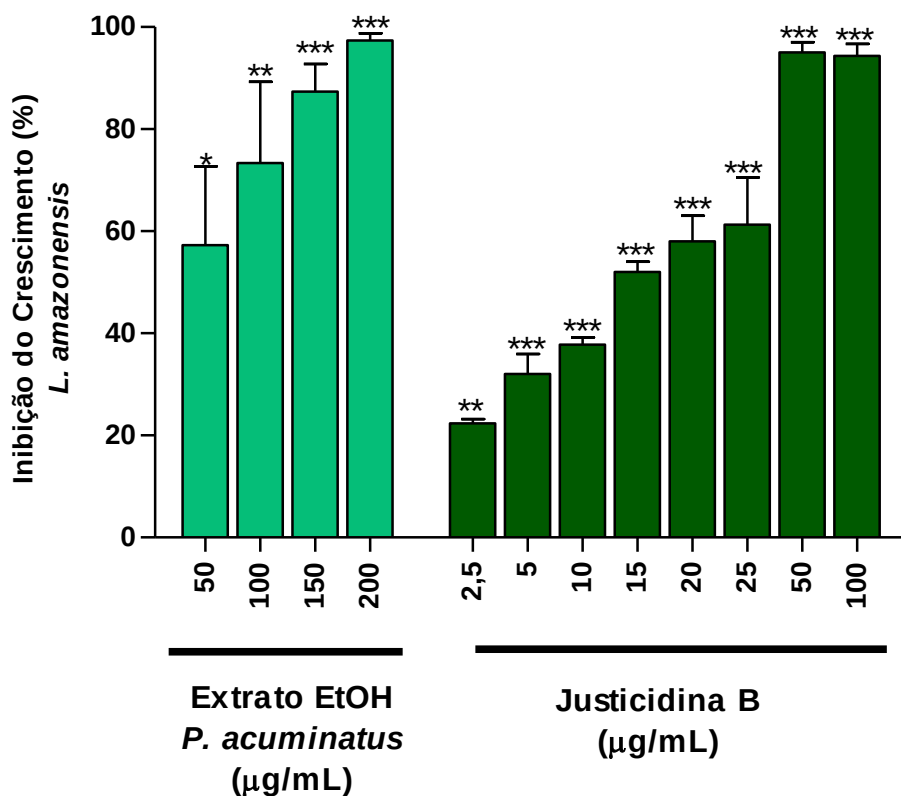
4.1 Atividade antileishmania de substâncias sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*

4.1.1 Atividade antileishmania do extrato etanólico de *Phyllanthus acuminatus* e da lignana Justicidina B

O extrato etanólico de *Phyllanthus acuminatus* inibiu o crescimento de formas promastigotas a partir da concentração de 50 µg/mL apresentando uma redução de $57,33\% \pm 15,38$ em relação ao controle (0%). O aumento das concentrações do extrato etanólico de *Phyllanthus acuminatus* induziu um aumento na inibição do crescimento de modo dependente de concentração, de forma que, as concentrações de 100, 150 e 200 µg/mL inibiram o crescimento em uma taxa de $73,33\% \pm 15,94$; $87,33\% \pm 5,45$ e $97,33\% \pm 1,45$ respectivamente em relação ao controle (Gráfico 1). O extrato etanólico de *Phyllanthus acuminatus* demonstrou uma CI_{50} de 35,58 µg/mL.

A lignana Justicidina B isolada da *Phyllanthus acuminatus* inibiu crescimento de formas promastigotas a partir da concentração de 2,5µg/mL em uma taxa de inibição de $22,33\% \pm 0,88$. Houve significativo aumento da inibição de crescimento com o aumento das concentrações testadas. As outras concentrações testadas foram 5, 10, 15, 20, 25, 50 e 100µg/mL, as quais inibiram o crescimento em uma taxa de $32\% \pm 3,93$; $37,75\% \pm 1,43$; $52\% \pm 2,08$; $58\% \pm 5$; $61,33\% \pm 9,17$; $95\% \pm 2,08$; $94,33\% \pm 2,04$ respectivamente, apresentando uma CI_{50} de 12,51 µg/mL (Gráfico 1).

Gráfico 1- Inibição do crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* na presença de diferentes concentrações do Extrato EtOH de *Phyllanthus acuminatus* e Justicidina B.



Fonte: DIAS, C.N.S. As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (1×10^6 células/mL) foram cultivadas em meio Schneider completo por 72 horas a 26°C na presença e na ausência das substâncias avaliadas. O gráfico representa à média $\pm$ erro padrão da média de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p \leq 0,05$ (Significância em relação ao controle).

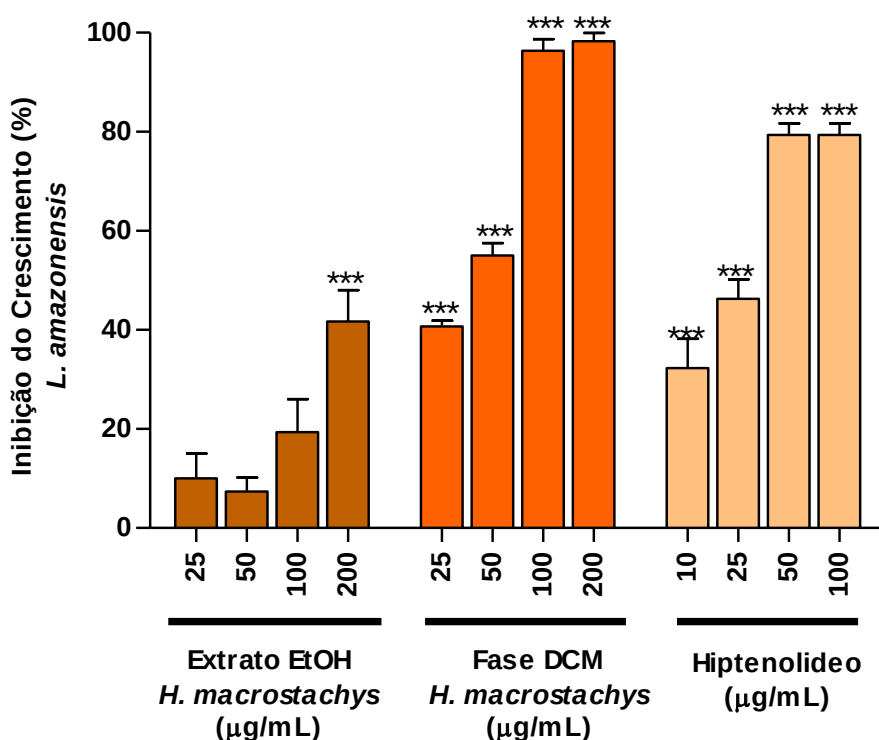
4.1.2 Atividade antileishmania do extrato etanólico, fase diclorometano e da nova pirona Hiptenolideo

A fase diclorometano de *Hyptis macrostachys* e o Hiptenolideo apresentaram atividade antileishmania contra as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* em todas as concentrações testadas, todavia, o extrato etanólico de *Hyptis macrostachys* apresentou atividade antileishmania significativa apenas na concentração de 200 µg/mL com uma taxa de inibição de 41,67% $\pm$ 6,33 em relação ao controle (Gráfico 2), resultando em uma CI_{50} de 280,69 µg/mL.

A fase diclorometano de *H. macrostachys* apresentou significativa redução no crescimento das culturas a partir da menor concentração testada (25µg/mL). Houve uma diminuição do crescimento das formas promastigotas com o aumento das concentrações. A concentração 25 µg/mL apresentou taxa de inibição de crescimento de $40,67\% \pm 1,20$, a qual foi ampliada com o aumento da concentração avaliada, resultando em CI_{50} de 55,30 µg/mL. As concentrações de 50; 100 e 200 µg/ml apresentaram taxa de inibição de $55\% \pm 2,51$; $96,33\% \pm 2,33$ e $98,33\% \pm 1,66$ respectivamente, como representado no gráfico 2.

O Hiptenolídeo apresentou significativa inibição de crescimento das formas promastigotas a partir da concentração de 10µg/mL com taxa de inibição de $32,33\% \pm 5,84$ em relação ao controle (0%). As demais concentrações testadas, que foram 25, 50 e 100µg/mL apresentaram taxa de inibição de $46,33\% \pm 3,84$; $79,33\% \pm 2,33$; $96,33\% \pm 0,33$ nessa ordem (Gráfico 2), resultando em uma CI_{50} de 22,67 µg/mL.

Gráfico 2- Inibição do crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* na presença de diferentes concentrações do Extrato EtOH, Fase diclorometano (DCM) e Hiptenolideo obtidos de *H. macrostachys*

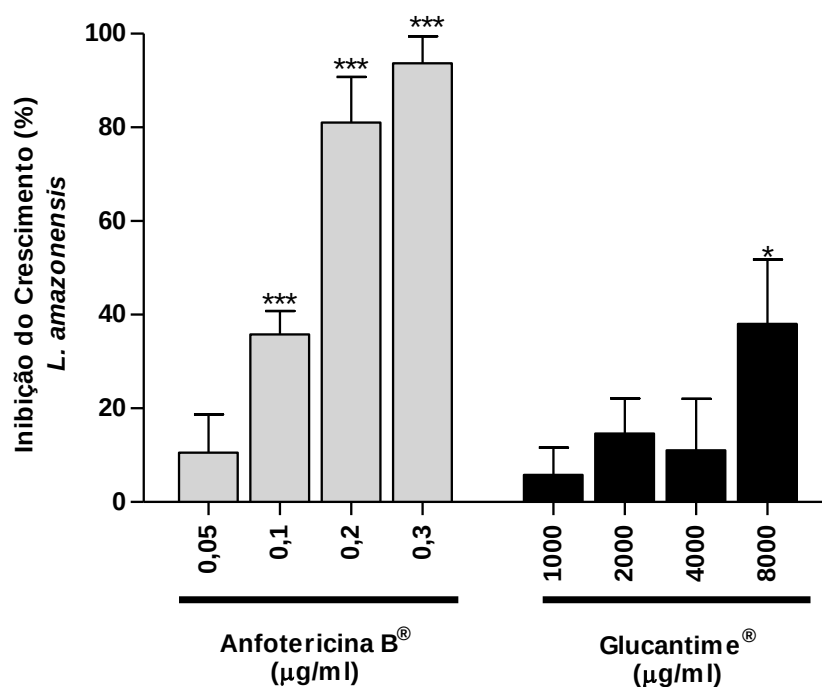


Fonte: DIAS, C.N.S. As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (1×10^6 células/mL) foram cultivadas em meio Schneider completo por 72 horas a 26°C na presença e na ausência das substâncias avaliadas. O gráfico representa à média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p \leq 0,05$ (Significância em relação ao controle).

4.1.3 Atividade antileishmania de Anfotericina B[®] e Glucantime[®]

A Anfotericina B[®] e o Glucantime[®], drogas de escolha utilizadas no tratamento das leishmanioses no Brasil (BRASIL, 2013), foram utilizados como drogas referência para a análise antipromastigota. As concentrações de 0,05; 0,1; 0,2 e 0,3 µg/mL de Anfotericina B[®] foram analisadas quanto à capacidade de inibição de formas promastigotas. As concentrações que inibiram significativamente o crescimento foram 0,1; 0,2 e 0,3 µg/mL, em uma taxa de inibição de 35,76% ± 5,01; 81,01% ± 9,8 e 93,71% ± 5,72 respectivamente. O Glucantime[®] foi avaliado nas concentrações de 1000; 2000; 4000 e 8000 µg/mL, porém a maior concentração foi a única que conseguiu inibir significativamente o crescimento, conforme mostrado no gráfico 3. Calculou-se o CI₅₀ para as duas drogas, os quais foram estimados em 0,13 µg/mL para a Anfotericina B[®] e 23760 µg/mL para o Glucantime[®].

Gráfico 3- Inibição do crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* na presença de diferentes concentrações de Anfotericina B[®] e Glucantime[®].



Fonte: DIAS, C.N.S. As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (1×10^6 células/mL) foram cultivadas em meio Schneider completo por 72 horas a 26°C na presença e na ausência das substâncias avaliadas. O gráfico representa a média ± erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em duplicata. * $p \leq 0,05$; *** $p \leq 0,001$ (Significância em relação ao controle).

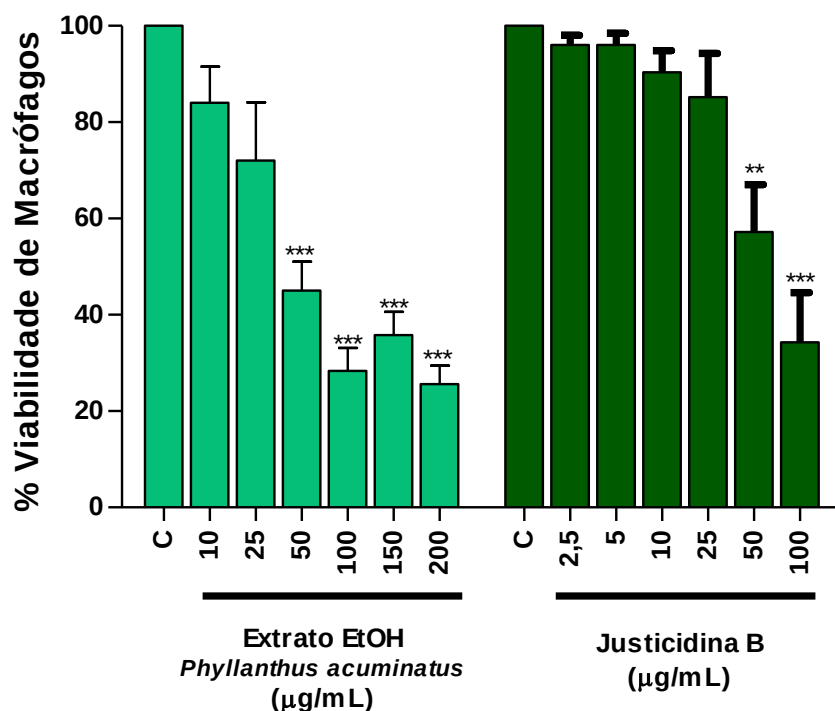
Os dados de inibição de crescimento sugerem se a substância analisada possui ou não atividade antileishmania, porém, esses dados não refletem de que modo essa atividade ocorre, se apenas inibindo o crescimento ou também provocando morte celular. Para tanto, além da quantificação realizou-se também a análise das culturas de promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com Justicidina B. Utilizando a microscopia ótica avaliaram-se qualitativamente as culturas de *Leishmania*, e sugeriu-se qual tipo de atividade antileishmania havia ocorrido. Após o tratamento com as diferentes concentrações da Justicidina B, verificou-se que, nas concentrações de 2,5 e 5µg/mL, mesmo observando-se uma significativa inibição do crescimento, as formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* apresentavam-se com mobilidade e aspecto morfológico semelhante às células da cultura controle, indicando uma atividade leishmaniostática dessa lignana. No entanto, a partir do tratamento com a concentração de 10µg/mL da Justicidina B e com o aumento dela, através da análise sob microscopia óptica, observaram-se várias alterações morfológicas nas formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* em relação à cultura controle, tais como, células imóveis e restos celulares, típicos de lise celular. Esses resultados sugerem também uma atividade leishmanicida desempenhada por essa lignana, uma vez demonstrado pela presença da maioria dos parasitas mortos.

4.2 Avaliação da citotoxicidade das substâncias testadas em células de mamíferos

4.2.1 Atividade citotóxica de *Phyllanthus acuminatus* e da lignana Justicidina B frente a macrófagos peritoneais murinos

A avaliação da atividade citotóxica frente a macrófagos murinos foi realizada pelo método de exclusão do corante vital azul de Tripan, para mensurar a toxicidade das substâncias testadas frente a células de mamíferos. O extrato etanólico de *Phyllanthus acuminatus* apresentou significativa toxicidade a partir da concentração de 50µg/mL resultando uma taxa de sobrevivência de macrófagos de $45\% \pm 6,05$. Com o aumento das concentrações observou-se também aumento da citotoxicidade, como demonstrado no gráfico 4. As taxas de sobrevivência foram de $28,33\% \pm 4,32$ para 100 µg/mL, $35,83\% \pm 4,79$ para 150 µg/mL e $25,67\% \pm 3,82$ para a concentração de 200 µg/mL. A CC_{50} obtida foi de 39,62 µg/mL.

Gráfico 4- Citotoxicidade do Extrato EtOH de *P. acuminatus* e da lignana Justicidina B frente a macrófagos peritoneais murinos.



Fonte: DIAS, C.N.S. Os macrófagos (1×10^6 células/mL) foram incubados por 24h em estufa de CO₂ a 37°C na presença de diferentes concentrações do EtOH de *P. acuminatus* e da lignana Justicidina B e posteriormente quantificados sob microscopia óptica na presença de azul de tripan. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata.

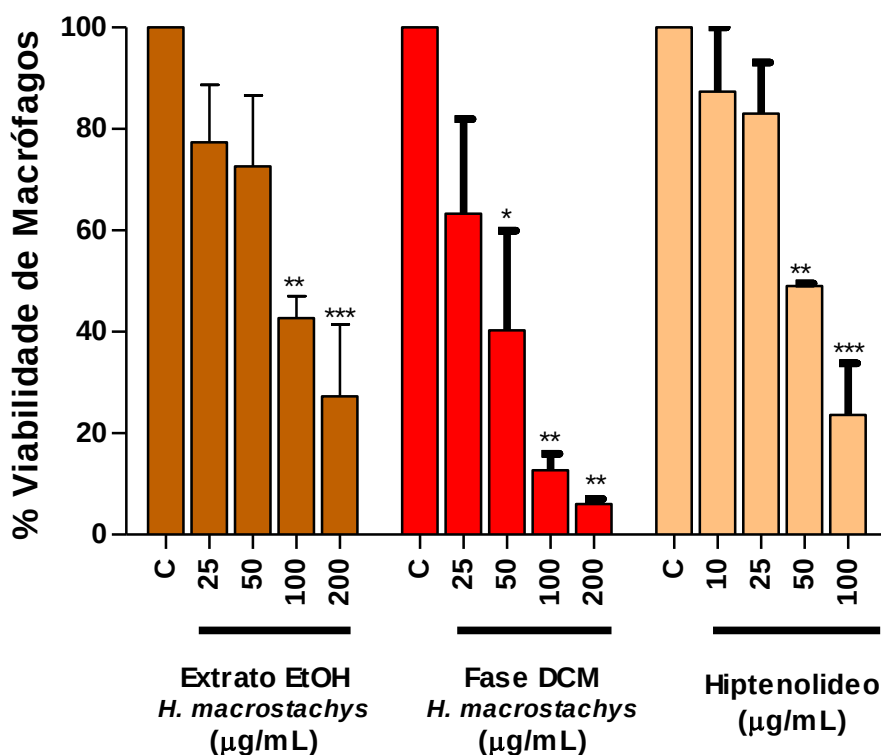
* $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$ (Significância em relação ao controle).

A lignana Justicidina B apresentou significativa diminuição na taxa de sobrevivência dos macrófagos nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, nas quais, as taxas foram de $57,20\% \pm 9,88$ e $34,33\% \pm 10,32$ respectivamente (Gráfico 4). As demais concentrações testadas foram 2,5; 5; 10; 25 µg/mL, apresentando taxas de sobrevivência de $96\% \pm 2$; $96\% \pm 2,44$; $90,33\% \pm 4,55$; $85,20\% \pm 9,08$; respectivamente, sendo sua CC₅₀ estimada de 58,56 µg/mL.

4.2.2 Atividade citotóxica do Extrato etanólico e Fase DCM de *Hyptis macrostachys* e da α - pirona Hiptenolideo frente a macrófagos peritoneais murinos

O extrato etanólico de *H. macrostachys* foi considerado tóxico para macrófagos peritoneais murinos apenas nas maiores concentrações avaliadas, que foram as de 100 e 200 $\mu\text{g/mL}$. As taxas de sobrevivência celular em relação ao controle para essas concentrações foram de $42,67\% \pm 4,33$ para 100 $\mu\text{g/mL}$ e $27,25\% \pm 14,18$ para 200 $\mu\text{g/mL}$ (Gráfico 6). As outras concentrações testadas demonstraram taxas de sobrevivência de $77,33\% \pm 11,39$ (25 $\mu\text{g/mL}$) e $72,67\% \pm 13,97$ (50 $\mu\text{g/mL}$), sendo sua CC_{50} estimada em 121,36 $\mu\text{g/mL}$.

Gráfico 5- Citotoxicidade do extrato EtOH, fase DCM e Hiptenolideo obtidos de *Hyptis macrostachys* frente a macrófagos peritoneais murinos.



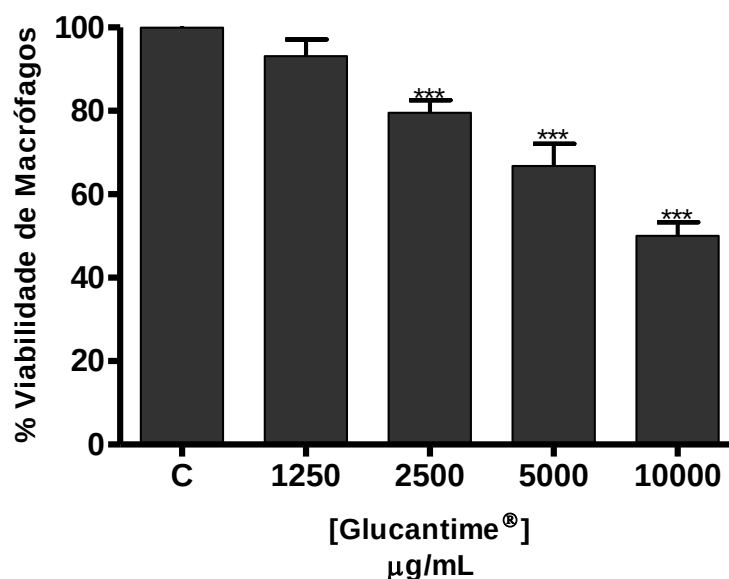
Fonte: DIAS, C.N.S. Os macrófagos (1×10^6 células/mL) foram incubados por 24h em estufa de CO_2 a 37°C na presença de diferentes concentrações do Extrato EtOH, fase DCM e Hiptenolideo obtidos de *H. macrostachys* e posteriormente quantificados sob microscopia óptica na presença de azul de tripan. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. * $P \leq 0,05$ (Significância em relação ao controle).

As concentrações da fase diclorometano de *H. macrostachys* avaliadas em relação à toxicidade foram de 25, 50, 100 e 200 µg/mL. Houve significativa toxicidade, demonstrada pela diminuição da sobrevivência celular em relação ao controle, nas concentrações de 50, 100 e 200 µg/mL. Essas concentrações apresentaram taxas de sobrevivência de 40,33% ± 19,62; 12,67% ± 3,28 e 6% ± 1,00 respectivamente, como mostrado no gráfico 5, resultando em uma CC₅₀ estimada em 40,45 µg/mL.

A nova α pirona isolada *H. macrostachys*, Hiptenolideo, apresentou significativa toxicidade para macrófagos murinos apenas nas duas maiores concentrações testadas. As taxas de sobrevivência dos macrófagos tratados em relação ao controle foram de 49% ± 0,57 e 23,67% ± 10,14 para as concentrações de 50 e 100 µg/mL respectivamente (gráfico 5). Frente às concentrações testadas estimou-se a CC₅₀ do Hiptenolídeo em 61,78 µg/mL.

4.2.3 Atividade citotóxica do Glucantime® frente a macrófagos peritoneais murinos

A citotoxicidade do Glucantime® como droga de referência também foi avaliada, observou-se significativa toxicidade a partir da concentração de 2500 µg/mL (Gráfico 9), estimando uma CC₅₀ de 9420 µg/mL com uma taxa de sobrevivência de 79,50% ± 3,07 em relação ao controle.

Gráfico 6- Citotoxicidade do Glucantime® frente a macrófagos peritoneais murinos.

Fonte: DIAS, C.N.S. Os macrófagos (1×10^6 células/mL) foram incubados por 24h em estufa de CO₂ a 37°C na presença de diferentes concentrações do Glucantime® e posteriormente quantificados sob microscopia óptica na presença de azul de tripan. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média de pelo menos três experimentos independentes realizados em duplicata. *** $P \leq 0,001$ (Significância em relação ao controle).

4.3 Determinação do índice de seletividade das substâncias em estudo

Partindo dos dados de inibição do crescimento e do ensaio de citotoxicidade frente à macrófagos peritoneais murinos, estimou-se a CI₅₀ (concentração capaz de inibir 50% do crescimento) e CC₅₀ (concentração citotóxica para 50% das células) de todas as substâncias testadas. O índice de seletividade é um indicativo *in vitro* se a substância tem atividade mais seletiva para o parasito (*Leishmania*) do que para a célula de mamífero, sendo determinado pela razão entre a CC₅₀ e CI₅₀ (Tabela 1).

Tabela 1 – Concentração inibitória de 50% do crescimento (IC_{50}) de promastigotas de *Leishmania amazonensis*; Concentração citotóxica para 50% de macrófagos peritoneais murinos (CC_{50}). Índice de Seletividade (CC_{50}/CI_{50}).

	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	Índice de Seletividade (CC_{50}/CI_{50})
EtOH <i>P.acuminatus</i>	35,58	39,62	1,11
Justicidina B	12,51	58,56	4,68
EtOH <i>H.macrostachys</i>	280,69	121,36	0,43
Fase DCM <i>H. macrostachys</i>	55,3	40,45	0,73
Hiptenolídeo	22,67	61,78	2,72
Glucantime®	23760	9420	0,39
Anfotericina B®	0,13	—	—

Fonte: DIAS, C.N.S. Utilizou-se regressão de probit com intervalo de confiança de 95%.

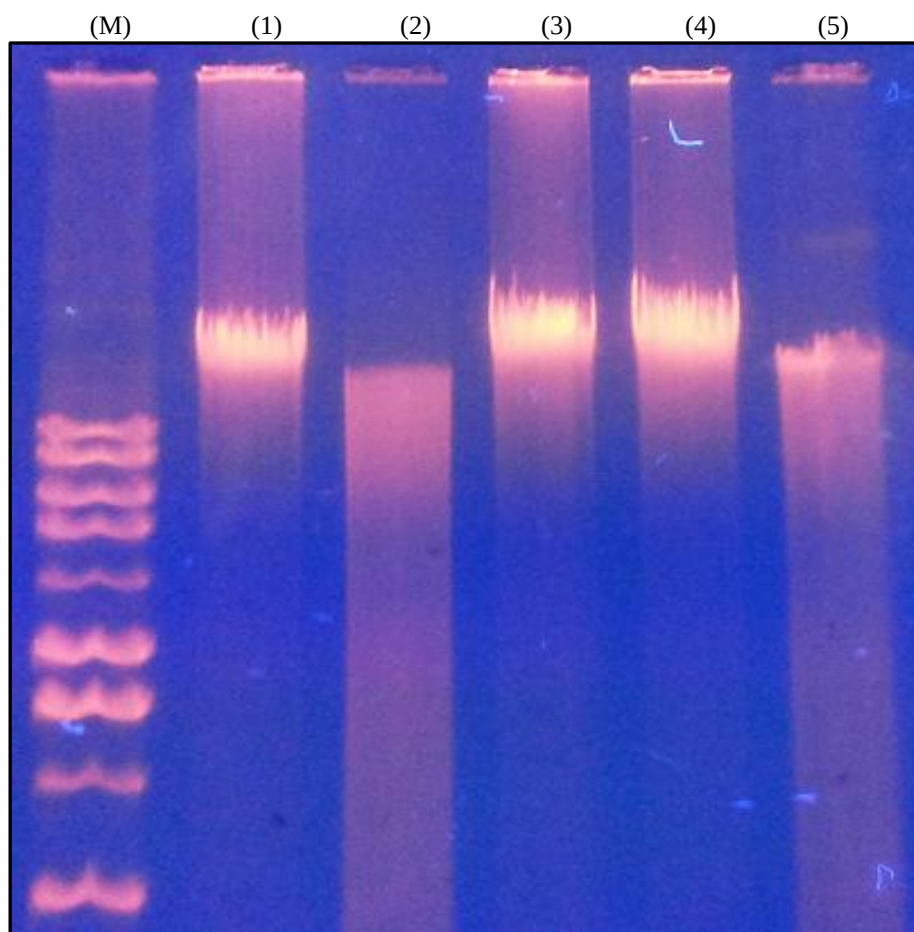
Diante dos resultados de CI_{50} , CC_{50} e índice de seletividade (IS), acima apresentados, a molécula que demonstrou maior perspectiva em sua investigação quanto à atividade antileishmania foi a Justicidina B. Neste sentido, buscou-se avaliar possíveis mecanismos de ação dessa lignana sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*, bem como, verificar uma possível ação sobre as formas amastigotas intracelulares.

4.4 Análise na fragmentação do DNA em formas promastigotas tratadas com a lignana Justicidina B

A análise da fragmentação do DNA nos permite uma melhor compreensão do processo de morte celular causado por uma substância leishmanicida. Portanto, para entender qual tipo de morte está associada ao tratamento com a lignana Justicidina B, formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* foram tratadas com essa lignana em diferentes concentrações. Em gel de agarose, avaliou-se o padrão de fragmentação do DNA destes parasitos após o tratamento com diferentes concentrações dessa lignana.

A fragmentação do DNA de *L. amazonensis*, após o tratamento, está demonstrada na figura 15. Como controle positivo utilizou-se o peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 4mM, visto que o tratamento com esta substância induz morte por apoptose (“apoptosis-like”) em promastigotas de *L. donovani* (DAS et al., 2001). Após o tratamento “overnight” com concentrações de CI_{50} , $2x CI_{50}$ e $4x CI_{50}$ de Justicidina B sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* observou-se que a maior concentração avaliada induziu a fragmentação do DNA desses parasitas semelhante ao observado no controle positivo (H_2O_2).

Figura 15- DNA genômico de *L. amazonensis* tratados com diferentes concentrações de Justicidina B ou com H_2O_2 4mM, em gel de agarose (1%).



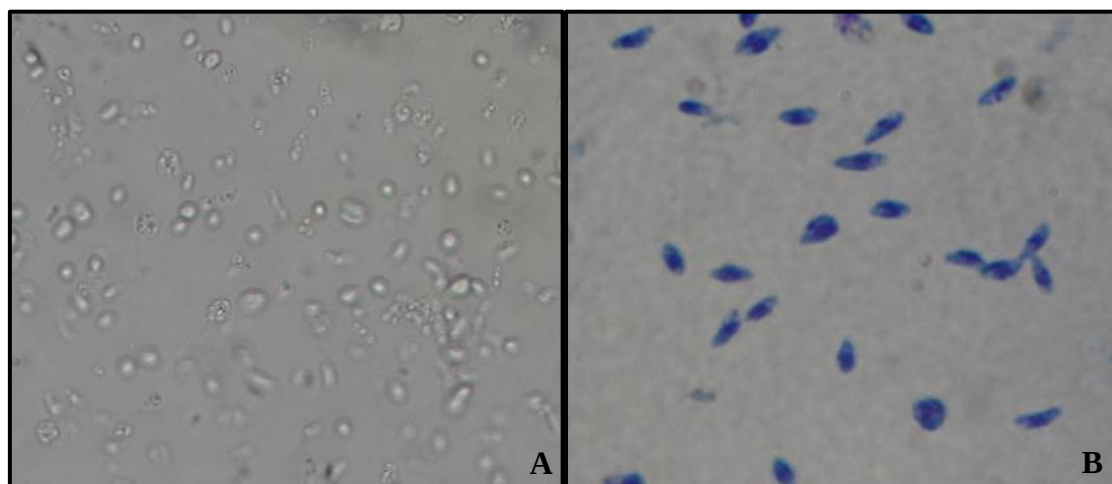
Fonte: DIAS, C.N.S. As formas promastigotas de *L. amazonensis* foram tratadas com diferentes concentrações Justicidina B ou com H_2O_2 4mM e submetidas a extração do DNA genômico. A eletroforese foi realizada em gel de agarose (1%), com corrida de 60V por 1h30m e o corante gel red (1: 500) foi diluído na própria amostra (4 μ l). A análise foi feita sob luz UV. (M) marcador molecular 1 kb DNA (300pb -10000pb- Axygen). (1) controle negativo; (2) H_2O_2 4mM (controle positivo); Justicidina B nas concentrações de IC_{50} (3), $2x IC_{50}$ (4), $4x IC_{50}$ (5).

4.5. Padronização de infecção de macrófagos peritoneais murinos frente a amastigotas axênicas e promastigotas de *L. amazonensis*

4.5.1 Transformação de promastigotas em amastigotas axênicas

As amastigotas axênicas foram transformadas a partir de formas promastigotas em fase estacionária de crescimento conforme metodologia descrita no item 3.7.1. As amastigotas axênicas foram identificadas qualitativamente por microscopia óptica. Observou-se, na cultura, ausência de flagelos e formato arredondado das células, característico dessa forma como mostrado na figura 16.

Figura 16- Fotomicrografia de formas amastigotas axênicas de *Leishmania amazonensis*.

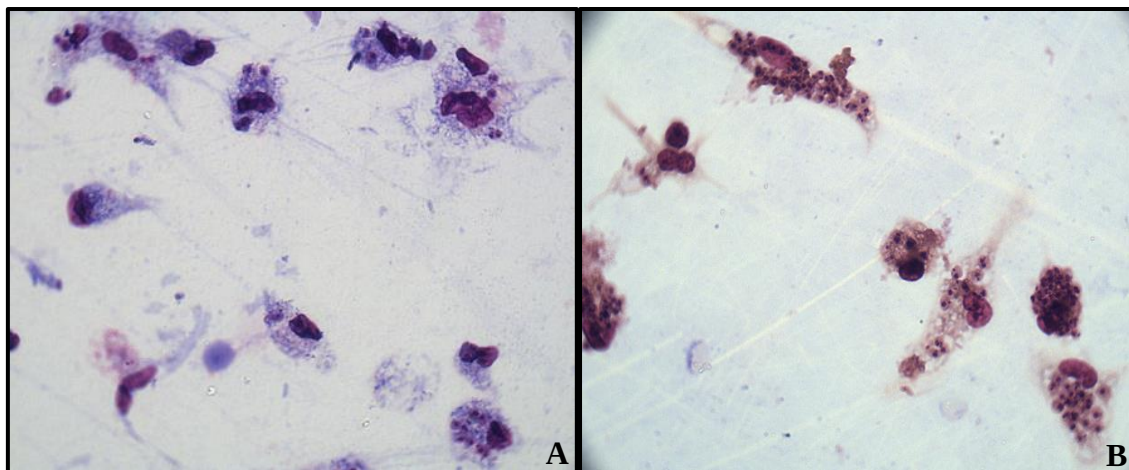


Fonte: DIAS, C.N.S. (A) Fotomicrografia de amastigotas axênicas de *L. amazonensis* em meio de cultura Schneider suplementado com 20% SBF pH 5,5. (B) Formas amastigotas axênicas coradas com coloração hematológica panótico rápido.

4.5.2 Infecção de macrófagos peritoneais murinos

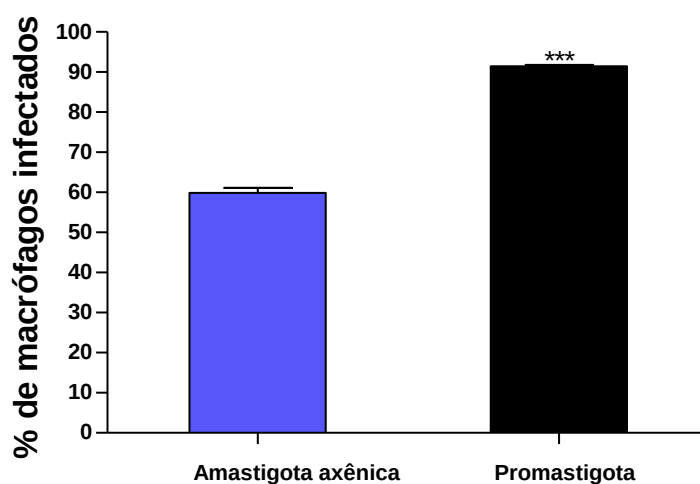
Os macrófagos peritoneais foram infectados com formas amastigotas axênicas e com formas promastigotas de *L. amazonensis*, em fase estacionária de crescimento (item 3.7.3). O resultado da infecção, após 72 horas, como ilustrado qualitativamente pela figura 17, foi de $59,89\% \pm 1,21$ de macrófagos infectados com amastigotas axênicas, enquanto que na infecção com as formas promastigotas, $91,48\% \pm 0,34$ dos macrófagos permaneceram infectados (Gráfico 7).

Figura 17- Fotomicrografia de macrófagos peritoneais murinos infectados com *L. amazonensis*.



Fonte: DIAS, C.N.S. (A) Macrófagos murinos infectados com formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis*. (B) Macrófagos infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis*. Ambas coradas com coloração hematológica panótico rápido (aumento 100x).

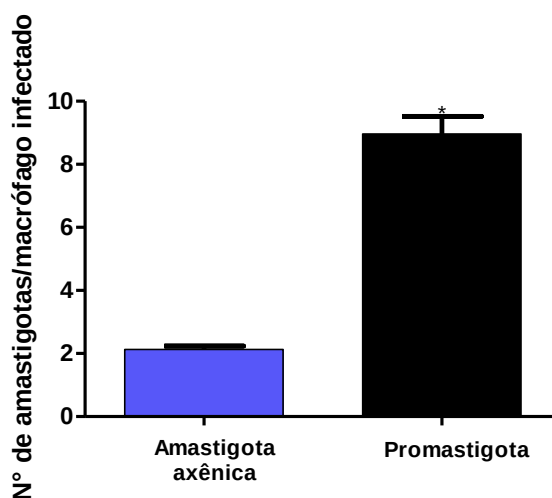
Gráfico 7- Porcentagem de infecção de macrófagos infectados com amastigotas axênicas e promastigotas de *L. amazonensis*.



Fonte: DIAS, C.N.S. Os macrófagos murinos foram infectados com amastigotas axênicas e promastigotas de *L. amazonensis* (razão 1:5) e incubados durante 72 horas, em estufa de 5% de CO₂ a 34°C. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em duplicata. *** $P \leq 0,001$ (Significância em relação ao controle).

Em relação ao parâmetro número de amastigotas por macrófago infectado, observou-se $2,13 \pm 0,10$ amastigotas por macrófago infectado, quando utilizou-se amastigotas axênicas. Contudo, quando os macrófagos foram infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* observou-se $8,9 \pm 0,56$ amastigotas por macrófago infectado, como demonstrado no gráfico 8 e ilustrado qualitativamente na figura 17.

Gráfico 8- Número de amastigotas por macrófago infectado com amastigotas axênicas e promastigotas de *L. amazonensis*.

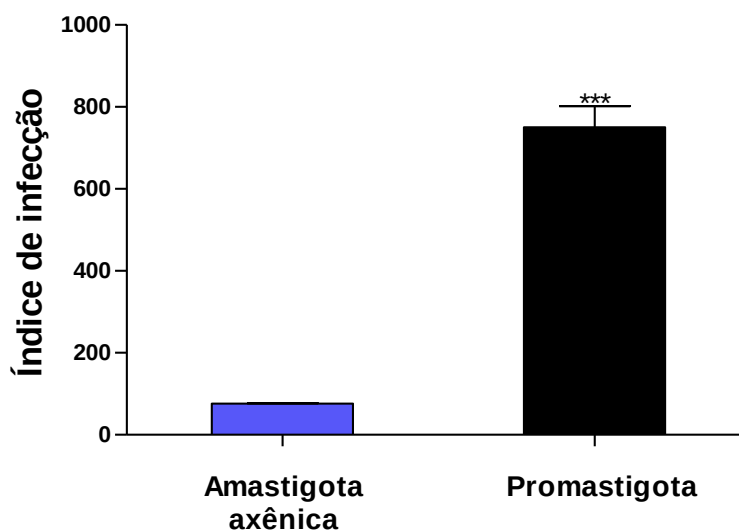


Fonte: DIAS, C.N.S. Os macrófagos murinos foram infectados com amastigotas axênicas e promastigotas de *L. amazonensis* (razão 1:5) e incubados durante 72 horas em estufa de 5% de CO₂ a 34°C. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em duplicata.

* $P \leq 0,05$ (Significância em relação ao controle).

Tendo como parâmetro o índice de infecção, parâmetro que expressa: porcentagem da infecção por número de amastigotas em razão do número total de macrófagos, foi observado um maior índice de infecção com as formas promastigotas (750), quando comparado com a infecção com as amastigotas axênicas (76) (Gráfico 9).

Gráfico 9- Índice de infecção de macrófagos infectados com amastigotas axênicas e promastigotas de *L. amazonensis*.



Fonte: DIAS, C.N.S. Os macrófagos murinos foram infectados com amastigotas axênicas e promastigotas de *L. amazonensis* (razão 1:5) e incubados durante 72 horas, em estufa de 5% de CO₂ a 34°C. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em duplicata.

*** $P \leq 0,001$ (Significância em relação ao controle).

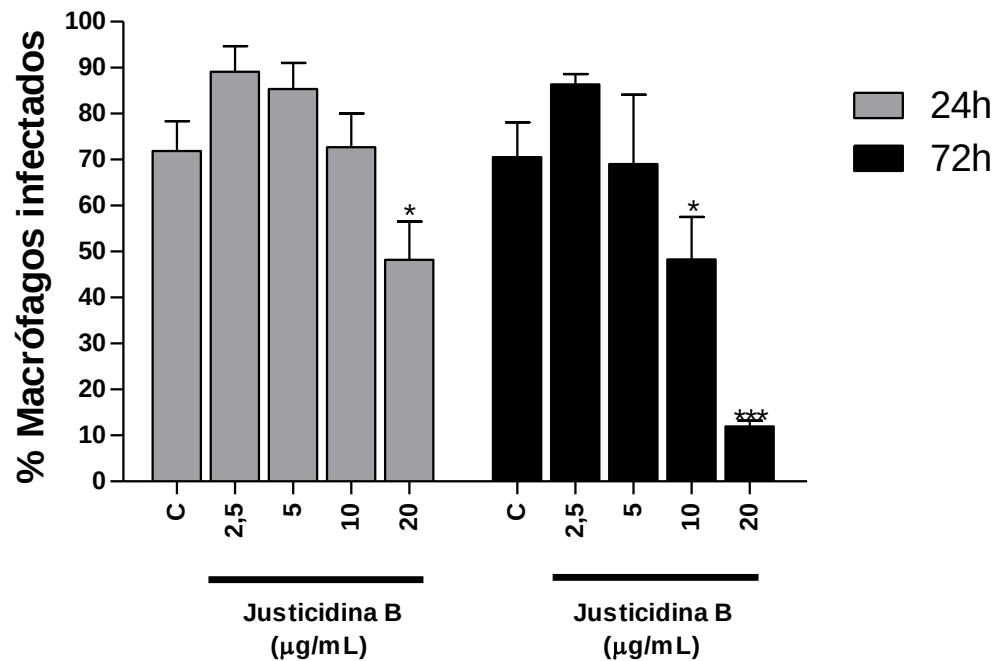
Após a avaliação dos parâmetros de infecção, utilizando as duas formas do ciclo de vida de *L. amazonensis*, observou-se a permanência de macrófagos murinos infectados com ambas as formas utilizadas. Entretanto, conforme observado nos gráficos acima apresentados, as formas promastigotas foram mais eficazes do que as formas amastigotas axênicas na manutenção da infecção dos macrófagos peritoneais murinos. Diante desse resultado, optou-se neste trabalho, por utilizar o modelo de infecção *in vitro* com as formas promastigotas de *L. amazonensis* para os estudos posteriores.

4.6. Macrófagos murinos infectados com *L. amazonensis* tratados com Justicidina B.

Para a avaliação da atividade da Justicidina B sobre formas amastigotas intracelulares, macrófagos infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* foram tratados com diferentes concentrações dessa lignana. A atividade de Justicidina B frente à infecção de macrófagos peritoneais foi avaliada através dos seguintes critérios: porcentagem de macrófagos infectados, número de amastigotas/ macrófago infectado e índice de infecção. O índice de infecção foi determinado por: porcentagem de macrófagos infectados multiplicado pelo número de amastigotas por macrófagos totais.

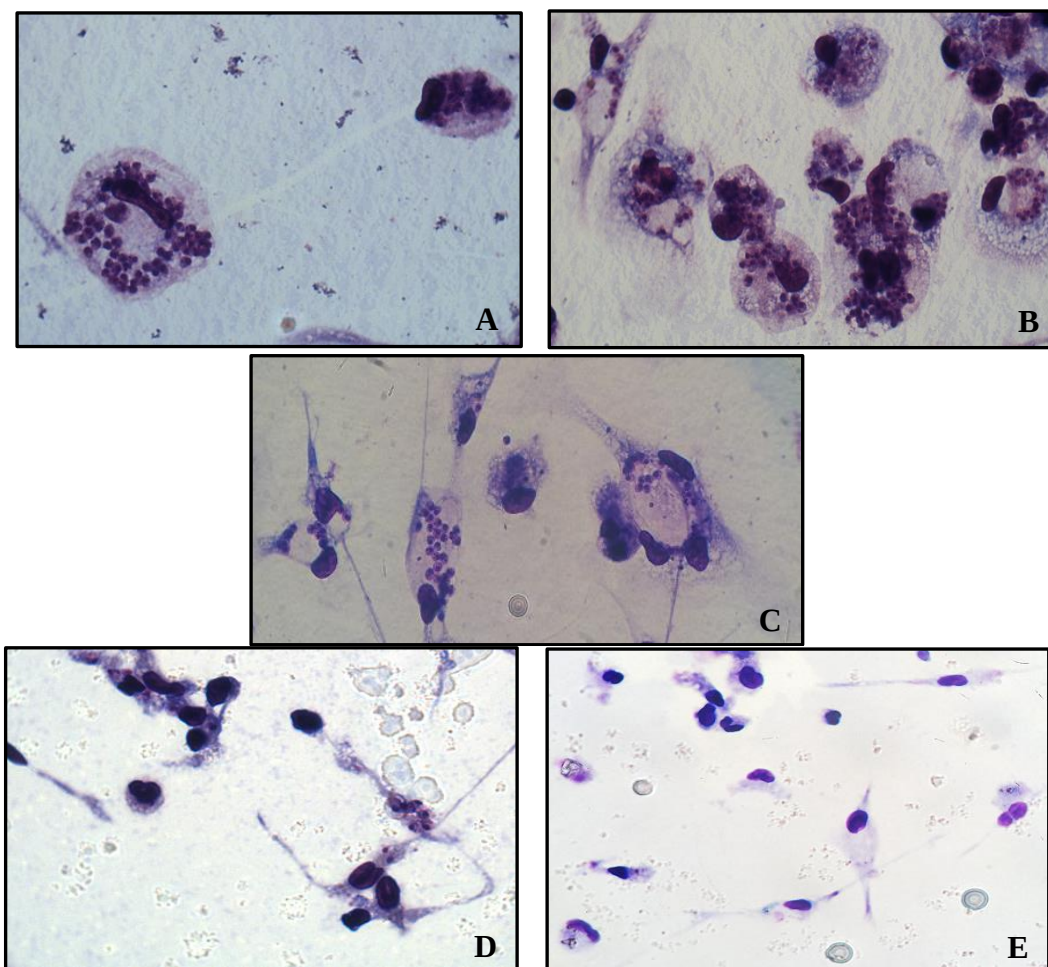
Após 72 horas de tratamento com a Justicidina B observou-se uma redução de macrófagos infectados nas duas maiores concentrações analisadas. O tratamento com 10µg/mL foi capaz de diminuir a de infecção em 31,48%. De uma forma mais significativa, o tratamento com 20 µg/mL após 72 horas de tratamento apresentou uma diminuição de 83% de macrófagos infectados (Gráfico10). A redução na infecção de macrófagos devido ao tratamento com a Justicidina B está ilustrada na figura 18.

Gráfico 10- Efeito da Justicidina B sobre a porcentagem de macrófagos infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis*.



Fonte: DIAS, C.N.S. Macrófagos murinos foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* (razão 1:5) e incubados na ausência controle (C) ou presença de diferentes concentrações da Justicidina B durante 24 e 72h em estufa de CO₂ a 34°C. Posteriormente as células foram coradas e quantificadas sob microscopia óptica. O gráfico representa a média ± erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em duplicata * $P \leq 0,05$; *** $P \leq 0,001$.

Figura 18 - Macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com diferentes concentrações de Justicidina B.

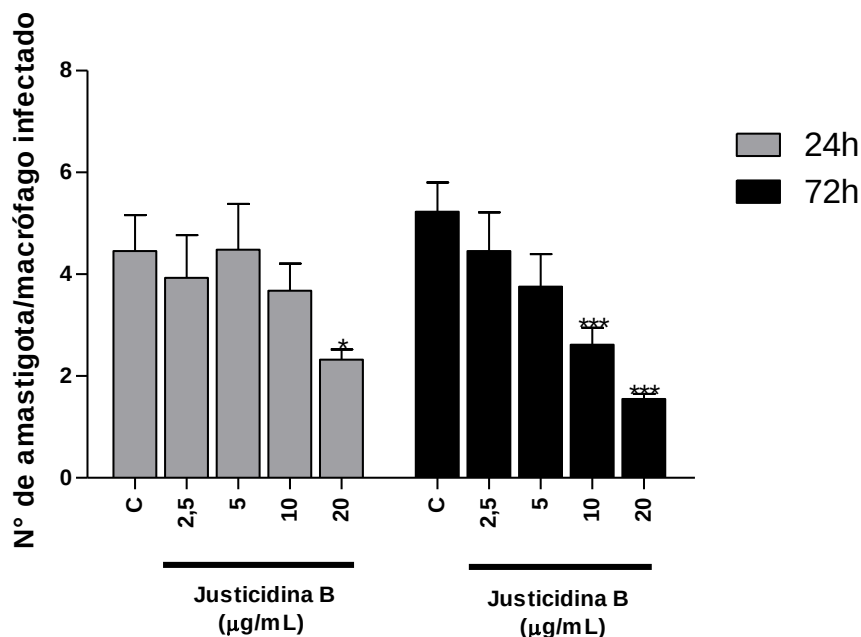


Fonte: DIAS, C.N.S. (A, B e C) Fotomicrografia de macrófagos infectados com promastigotas de *L. amazonensis*. (D) macrófagos infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* após 72h de tratamento com 10µg/mL de Justicidina B. (E) macrófagos infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* após 72h de tratamento com 20µg/mL de Justicidina B.

O segundo critério para avaliar a atividade antiamastigota da Justicidina B foi a quantificação do número de amastigotas por macrófago infectado. Houve diminuição nesse parâmetro após os dois tempos de tratamento com a lignana Justicidina B.

Após 24 horas, observou-se redução de 47% do número de amastigotas por macrófago na concentração de 20 µg/mL, conforme demonstrado no gráfico 11. O tratamento por 72 horas resultou em uma diminuição ainda mais significativa no número de amastigota por macrófago infectado, tanto no tratamento com 20 µg/mL (70%) quanto no tratamento com 10 µg/mL (50%), como representado no gráfico 14 e ilustrado qualitativamente na figura 18.

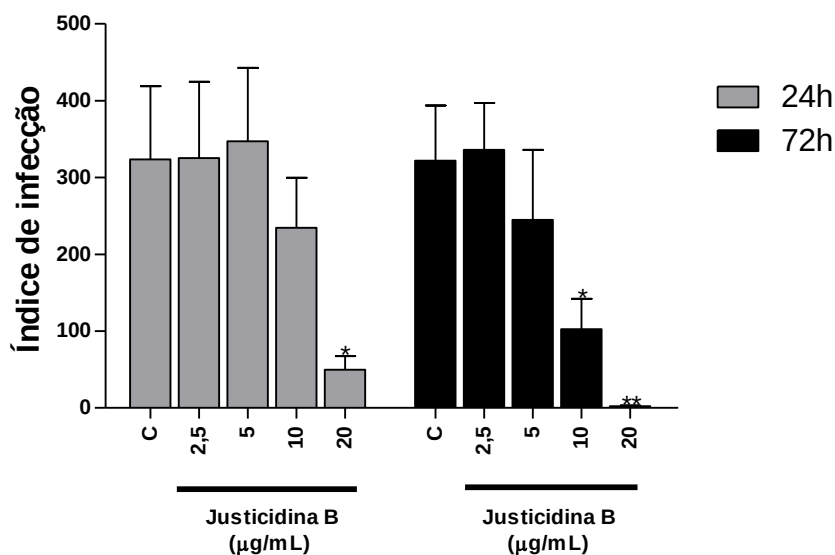
Gráfico 11- Efeito da Justicidina B sobre o número de amastigota por macrófago infectado com formas promastigotas de *L. amazonensis*.



Fonte: DIAS, C.N.S. Macrófagos murinos foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* (razão 1:5) e incubados na ausência controle (C) ou presença de diferentes concentrações da Justicidina B durante 24 e 72h em estufa de CO₂ a 34°C. Posteriormente as células foram coradas e quantificadas sob microscopia óptica. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em duplicata * $P \leq 0,05$; *** $P \leq 0,001$.

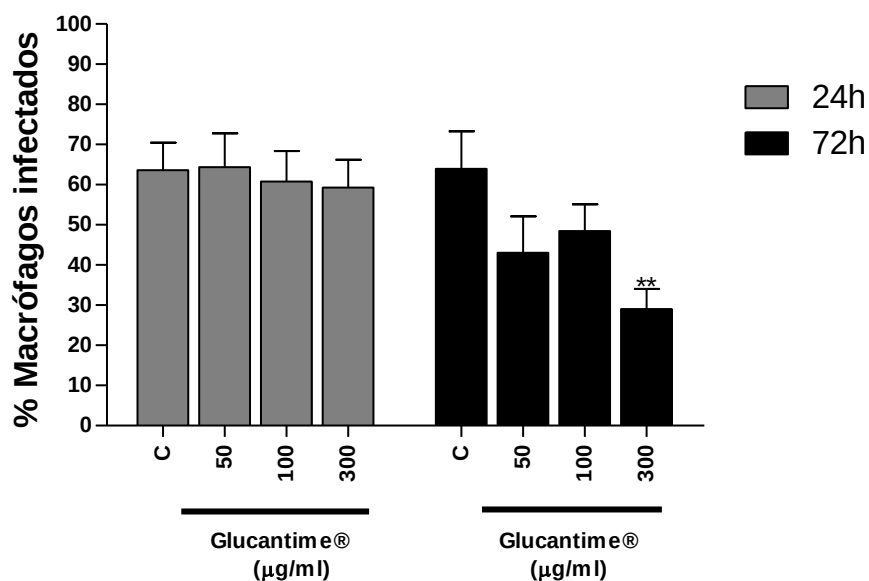
No que diz respeito ao índice de infecção, quando os macrófagos foram tratados por 24 horas com 20 µg/mL da Justicidina B, houve uma diminuição de 85% em relação ao controle, como demonstrado no gráfico 15. Após 72 horas de tratamento observou-se uma redução ainda maior do índice de infecção, sendo observada uma redução nas duas maiores concentrações avaliadas da Justicidina B. O tratamento com 10 µg/mL resultou em diminuição de 68% em relação ao controle e o tratamento com 20 µg/mL apresentou redução de 99% do índice de infecção, como demonstrado no gráfico 12.

Gráfico 12- Efeito da Justicidina B sobre o índice de infecção de macrófagos infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis*.



Fonte: DIAS, C.N.S. Macrófagos murinos foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* (razão 1:5) e incubados na ausência controle (C) ou presença de diferentes concentrações da Justicidina B durante 24 e 72h em estufa de CO₂ a 34°C. Posteriormente as células foram coradas e quantificadas sob microscopia óptica. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em duplicata * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$.

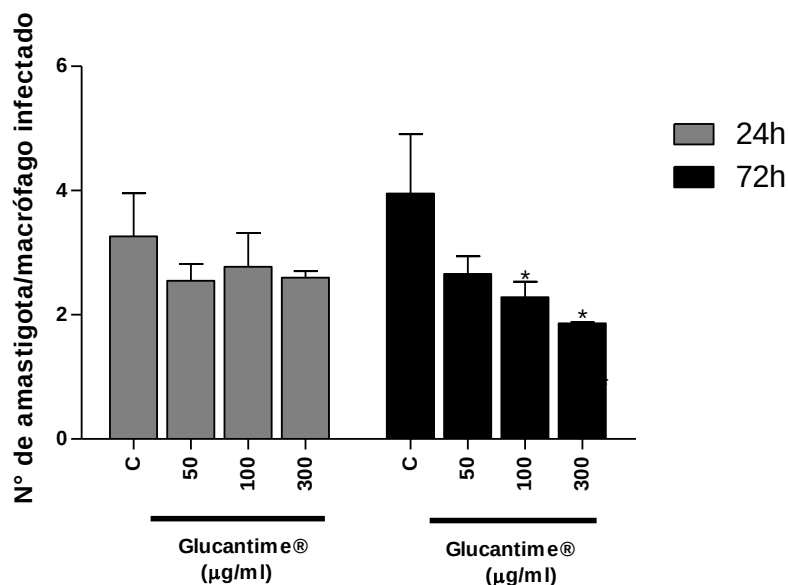
Como droga de referência foi utilizada o Glucantime[®], que não demonstrou nenhuma alteração da porcentagem de infecção nas concentrações avaliadas após 24 horas de tratamento. Contudo, após 72 horas de tratamento, o Glucantime[®] foi capaz de diminuir significativamente a porcentagem de macrófagos infectados na maior concentração testada (300µg/mL), apresentando uma redução de 54,53% na infecção de macrófagos infectados (Gráfico 13).

Gráfico 13- Efeito Glucantime® sobre a porcentagem de macrófagos infectados com *L. amazonensis*.

Fonte: DIAS, C.N.S. Macrófagos murinos foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* (razão 1:5) e incubados na ausência controle (C) ou presença de diferentes concentrações da Glucantime® durante 24 e 72h em estufa de CO₂ a 34°C. Posteriormente as células foram coradas e quantificadas sob microscopia óptica. O gráfico representa a média ± erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em duplicata ** $P \leq 0,01$.

Em relação ao número de amastigota por macrófago infectado, o Glucantime® após 24h de tratamento não apresentou nenhum efeito. Somente após 72 horas de tratamento, as concentrações de 100µg/mL e 300µg/mL do Glucantime® foram capazes de reduzir em 42% e 53% respectivamente o número de amastigotas por macrófago infectado (Gráfico 14).

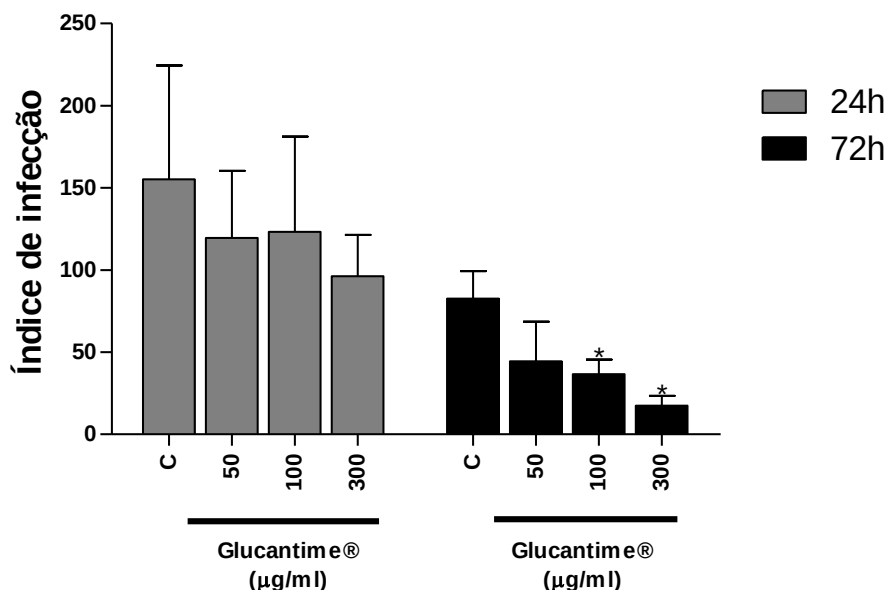
Gráfico 14- Efeito do Glucantime® sobre o número de amastigota por macrófago infectado com formas promastigotas de *L. amazonensis*.



Fonte: DIAS, C.N.S. Macrófagos murinos foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* (razão 1:5) e incubados na ausência controle (C) ou presença de diferentes concentrações do Glucantime® durante 24 e 72h em estufa de CO₂ a 34°C. Posteriormente as células foram coradas e quantificadas sob microscopia óptica. O gráfico representa a média ± erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em duplicata * $P \leq 0,05$.

O tratamento com o Glucantime® não diminuiu o índice de infecção após 24 horas de tratamento. Porém, após 72 horas de tratamento houve diminuição de 56% do índice de infecção quando os macrófagos foram tratados com 100 µg/mL de Glucantime® e redução de 79% quando os macrófagos foram tratados com 300 µg/mL (Gráfico 15).

Gráfico 15- Efeito do Glucantime® sobre o índice de infecção de macrófagos infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis*.



Fonte: DIAS, C.N.S. Macrófagos murinos foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* (razão 1:5) e incubados na ausência controle (C) ou presença de diferentes concentrações de Glucantime® durante 24 e 72h em estufa de CO₂ a 34°C. Posteriormente as células foram coradas e quantificadas sob microscopia óptica. O gráfico representa a média ± erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em duplicata * $P \leq 0,05$.

Os valores do índice de infecção foram usados para determinar a concentração efetiva para diminuir 50% da infecção (CE₅₀). Os resultados obtidos estão demonstrados na tabela 2.

Tabela 2 – Concentração efetiva para diminuir 50% (CE₅₀) da infecção após 24 horas e 72 horas de tratamento com Glucantime®

	CE ₅₀	
	24horas	72horas
Justicidina B	9,14	3,58
Glucantime®	ND*	163,49

Fonte: DIAS, C.N.S. Os valores do índice de infecção foram usados para calcular a CE₅₀ através da análise da regressão de probit pelo programa SPSS para Windows 8.0. ND – Não detectado.

4.7 - Análise da atividade imunomoduladora da Justicidina B sobre macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis*.

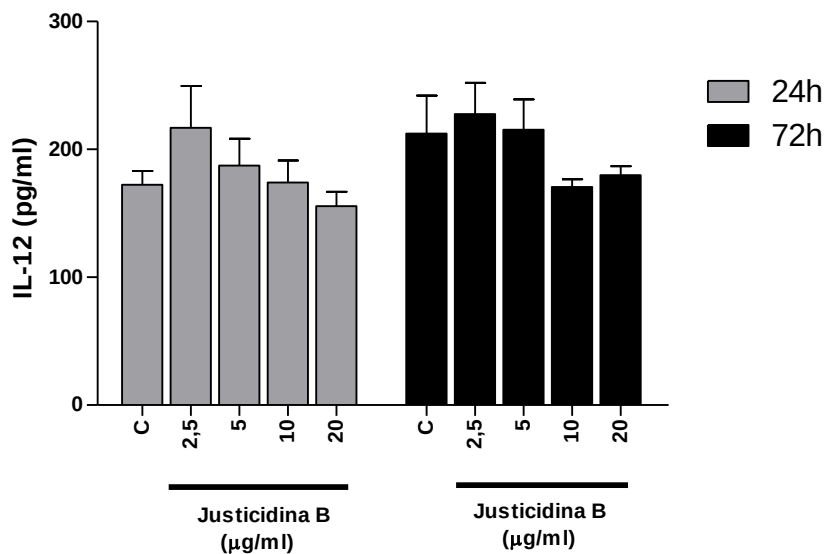
Devido à diminuição da infecção de macrófagos tratados com Justicidina B, investigou-se se essa inibição poderia estar associada a uma possível atividade imunomoduladora provocada pela Justicidina B sobre macrófagos infectados com *L. amazonensis*. Para tanto, avaliou-se os níveis das citocinas, IL-12, IL-6 e IL-10, bem como de óxido nítrico no sobrenadante desses macrófagos.

Os níveis de IL-12, mensurados a partir dos sobrenadantes de macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com a lignana Justicidina B, foram os mesmos dos macrófagos infectados não tratados com essa lignana, mostrando que não houve nenhuma alteração na síntese da citocina IL-12 após os tratamentos (Gráfico 16).

Os resultados obtidos demonstraram que não houve diferença significativa na síntese de IL-6 por macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com diferentes concentrações de Justicidina B durante 24 horas e 72 horas, como demonstrado no gráfico 17.

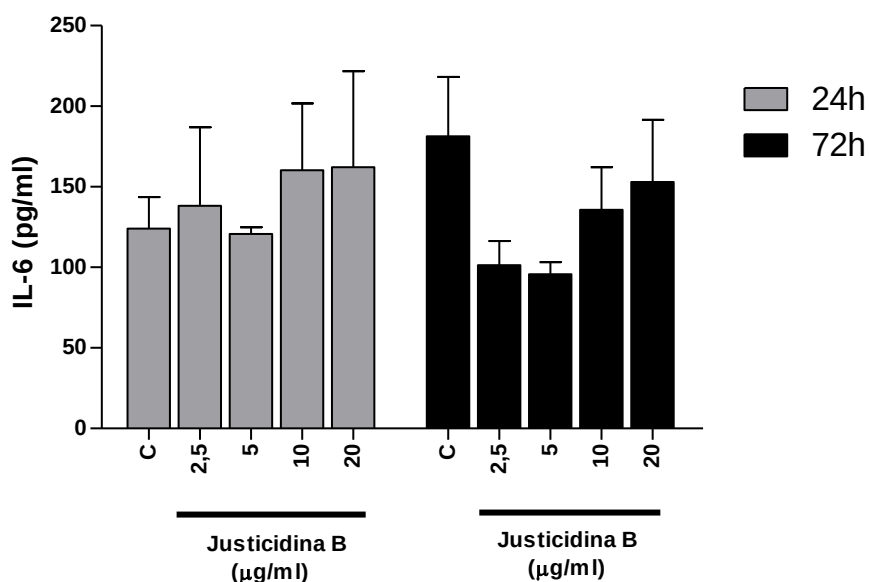
A análise dos níveis de IL-10 evidenciou uma diminuição na sua síntese por macrófagos infectados com *L. amazonensis* quando tratados com 10 e 20µg/mL após os dois períodos avaliados, 24 horas e 72 horas de tratamento (Gráfico 18), mostrando que essa lignana inibe a síntese desta citocina nesse modelo de infecção.

Gráfico 16– Níveis da citocina IL-12 no sobrenadante de macrófagos murinos infectados com *L. amazonensis*.



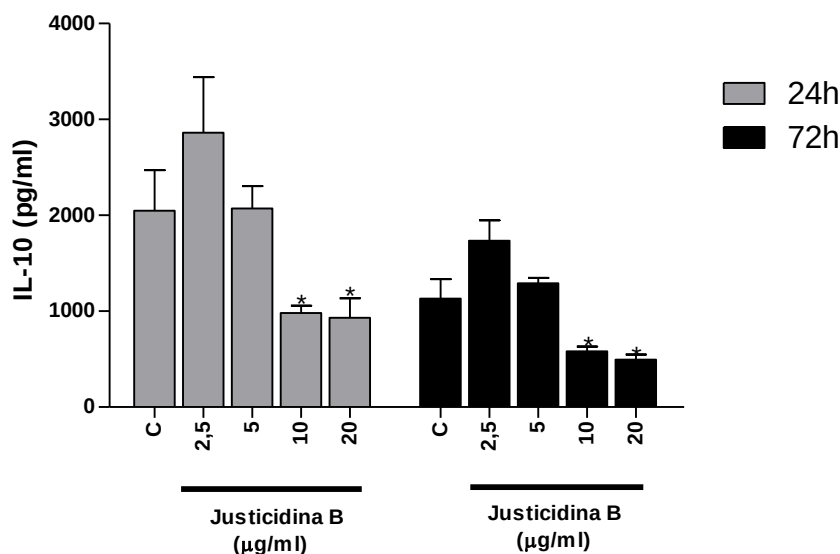
Fonte: DIAS, C.N.S. Macrófagos murinos foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* (razão 1:5) e incubados na ausência controle (C) ou presença de diferentes concentrações de Justicidina B durante 24 e 72h em estufa de CO₂ a 34°C. Foram mensurados os níveis de IL-12 através de ensaio imunoenzimático (ELISA). O gráfico representa a média ± erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em duplicata.

Gráfico 17– Níveis da citocina IL-6 no sobrenadante de macrófagos murinos infectados com *L. amazonensis*.



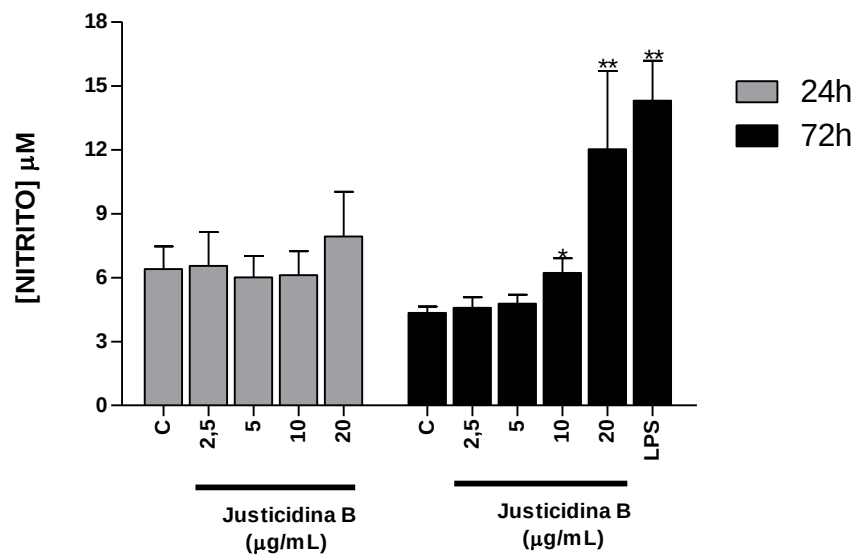
Fonte: DIAS, C.N.S. Macrófagos murinos foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* (razão 1:5) e incubados na ausência controle (C) ou presença de diferentes concentrações de Justicidina B durante 24 e 72h em estufa de CO₂ a 34°C. Foram mensurados os níveis de IL-6 através de ensaio imunoenzimático (ELISA). O gráfico representa a média ± erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em duplicata.

Gráfico 18– Níveis da citocina IL-10 no sobrenadante de macrófagos murinos infectados com *L. amazonensis*.



Fonte: DIAS, C.N.S. Macrófagos murinos foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* (razão 1:5) e incubados na ausência controle (C) ou presença de diferentes concentrações de Justicidina B durante 24 e 72h em estufa de CO₂ a 34°C. Foram mensurados os níveis de IL-10 através de ensaio imunoenzimático (ELISA). O gráfico representa a média ± erro padrão da média de três experimentos independentes realizados em duplicata * $P \leq 0,05$.

Posteriormente foi investigado se a diminuição da infecção pelo tratamento com Justicidina B está correlacionado com um aumento na produção de NO. Macrófagos infectados e tratados com diferentes concentrações de Justicidina B por 24 horas, não demonstraram nenhuma alteração nos níveis de NO, quando comparados com o controle. Contudo, os níveis de NO presente nos sobrenadantes dos macrófagos infectados e tratados com Justicidina B ou LPS demonstram significativa produção dessa molécula leishmanicida após 72 horas de tratamento nas duas maiores concentrações avaliadas. Quando comparados com o controle, que produziu 4,53 µM de nitrito, macrófagos tratados com 10 µg/mL e 20 µg/mL de Justicidina B demonstraram aumento na produção de nitrito, produzindo 6,21 µM e 12 µM de nitrito respectivamente. O LPS, utilizado como controle positivo na produção de NO, produziu 14,30 µM (Gráfico 19).

Gráfico 19 – Níveis de nitrito produzido por macrófagos murinos infectados com *L. amazonensis*.

Fonte: DIAS, C.N.S. Macrófagos murinos infectados com *L. amazonensis* foram incubados em estufa de CO₂ a 34°C na presença de diferentes concentrações de Justicidina B durante 24 e 72 horas, os sobrenadantes das culturas foram avaliados quanto à presença de nitrito utilizando o reagente de Griess. O gráfico representa a média ± erro padrão da média de três experimentos independentes. * $P \leq 0,05$; ** $P \leq 0,01$.

5 DISCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Os tratamentos clássicos das leishmanioses requerem a administração, geralmente via parenteral, de drogas tóxicas e pouco toleradas. Por isso, as drogas de escolha utilizadas no tratamento das leishmanioses tem seu uso restrito e cuidadoso devido aos fortes efeitos colaterais provocados. Os mais frequentemente relatados são: dor músculo esquelética, náuseas, vômitos, diarreia, nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (HEPBURN et al., 1994; RODRIGUES et al., 1999; OLIVEIRA et al., 2011). Além disso, no caso da leishmaniose cutânea difusa, provocada por *L. amazonensis*, ocorre resistência ao tratamento com as drogas disponíveis. Diante dessa problemática, há uma necessidade de se buscar novas drogas mais eficazes e menos tóxicas para o hospedeiro. Nesse contexto inserem-se os produtos naturais isolados de plantas como fonte compostos quimioterápicos com maior atividade e menos efeitos colaterais (TIUMAN et al., 2011).

Na busca por drogas potencialmente ativas contra *Leishmania* sp., o grupo do Laboratório de Leishmanioses do Departamento de Biologia Molecular da Universidade Federal da Paraíba, tem buscado ao longo de alguns anos investigar atividades de algumas substâncias com atividade antileishmania, especialmente lignanas e neolignanas (MONTE-NETO et al., 2007; CALDAS, 2010; NÉRIS et al., 2013). Neste trabalho buscou-se investigar a atividade antileishmania de substâncias derivadas de duas espécies de plantas, *Hyptis macrostachys* e *Phyllanthus acuminatus*, com o intuito de encontrar substâncias promissoras para o tratamento das leishmanioses.

Nos experimentos realizados observou-se que Extrato EtOH e a fase DCM obtidos de *Hyptis macrostachys*, bem como o Hiptenolideo, uma nova α -pirona isolada a partir da fase DCM, apresentaram significativa atividade antileishmania sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* inibindo seu crescimento *in vitro*, demonstrando CI_{50} de 280,69 $\mu\text{g/mL}$ para EtOH, 55,3 $\mu\text{g/mL}$ para a fase DCM e 22,67 $\mu\text{g/mL}$ para o Hiptenolideo. Dessa forma, houve um aumento da atividade antileishmania à medida que se processou a purificação das amostras, comparando-se as três amostras avaliadas, o Hiptenolideo em relação à fase DCM, e a fase DCM em relação ao Extrato EtOH de *H. macrostachys*.

Além dos resultados apresentados neste trabalho, até o momento, nenhuma atividade antileishmania foi descrita na literatura para *H. macrostachys*. Foi observado, para o Extrato EtOH dessa espécie de planta (SOUZA et al., 2013), bem como para a pirona Hiptenolideo, uma atividade espasmolítica quando testadas em íleo de cobaia (COSTA et al., 2014). Outras espécies do gênero *Hyptis* também têm sido relatadas como responsáveis por importantes atividades biológicas, inclusive atividade antileishmania (FALCÃO, MENEZES, 2003; CÉLINE et al., 2009; PICKING et al., 2013; LIMA et al., 2013). Céline e colaboradores (2009) demonstraram que o Extrato EtOH de *Hyptis lacustris* apresenta atividade antileishmania contra formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis* apresentando uma CI_{50} 10 $\mu\text{g/mL}$. Em relação as pironas, a qual pertence o Hiptenolideo, há poucos relatos de atividade antileishmania. Sabe-se que duas γ pironas avaliadas contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. donovani* demonstraram valores de IC_{50} de 3,76 $\mu\text{g/mL}$ e 8,59 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente (KAYSER et al., 2003). Apesar de escassos estudos que investigam a atividade antileishmania, os dados obtidos nesse estudo reforçam a potencialidade antileishmania das pironas.

Nos ensaios para investigar a citotoxicidade de *H. macrostachys* para macrófagos murinos de camundongos suíços utilizou-se o método de exclusão do corante vital azul de tripan. Esse método é bastante sensível na avaliação da citotoxicidade e baseia-se no princípio de que as células vivas possuem membranas celulares intactas capazes de excluir certos corantes, como o azul de tripan (STROBER, 1997). Monte Neto e colaboradores (2008) avaliando a citotoxicidade da lignana Iangambina, por dois métodos distintos, observou que existe uma maior sensibilidade utilizando o método de exclusão pelo azul de tripan em relação ao método de redução do MTT [3-(4,5-dimetiltiazol-2il)-2,5-difeniltetrazolium brometo].

Em relação à citotoxicidade do extrato EtOH, frente à macrófagos peritoneais murinos, observou-se significativa citotoxicidade a partir da concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$, concentração que não foi suficiente para inibir o crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis*. A fase DCM, apresentou-se citotóxica a partir da concentração de 50 $\mu\text{g/mL}$. Esses resultados demonstram índices de seletividade abaixo de 1,0 para ambas as substâncias, sugerindo uma toxicidade maior para células de mamíferos do que para o parasita. O Hiptenolideo mostrou-se citotóxico quando os macrófagos foram

tratados com concentrações a partir de 50µg/mL, porém sua atividade antileishmania foi demonstrada a partir da concentração de 10 µg/mL. Dessa forma, demonstrou ser mais tóxica para células de *Leishmania* que para células de mamíferos, porém ainda com um baixo índice de seletividade (2,72).

Alguns estudos demonstram que a avaliação da citotoxicidade *in vitro* em células de mamíferos (EVANS et al., 2001), especialmente para linhagem granulocítica/monocítica (CFU-GM), da qual derivam-se os macrófagos, poderia ajudar a refinar a previsibilidade da toxicidade aguda de uma determinada substância, em relação a quanto ela pode afetar o sistema hematopoiético mieloide e estimar a toxicidade aguda *in vivo* (CERRATO et al., 2009). Portanto, diante dos resultados observados neste estudo, as substâncias avaliadas acima não possuem características que as classifiquem como moléculas promissoras no tratamento da leishmaniose humana.

Outra espécie de planta estudado neste trabalho foi *P. acuminatus*, da qual foi avaliada a atividade antileishmania do Extrato EtOH etanólico e da lignana Justicidina B. Essa lignana já foi também isolada de outras espécies de plantas, dentre elas *Justicia pectoralis*, *Phyllanthus piscatorium*, *Linum austriacum*, *Linum perene*, *Linum lewisii*, *Linum altaicum* e *Justicia procumbens* (JOSEPH et al., 1988; GERTSCH et al., 2003; SCHMIDT ET AL., 2007; MOHAGHEGHZADEH et al., 2002; KONUKLUGIL et al., 2007; VASILEV; IONKOVA, 2005; LUO et al., 2014). O isolamento da Justicidina B utilizada neste trabalho foi feito a partir da espécie *Phyllanthus acuminatus*, o que possibilita uma nova alternativa na obtenção dessa lignana, bem como seu isolamento em quantidade suficiente para realização de ensaios biológicos. O isolamento a partir dessa espécie garante um rendimento de 3.36% (DUARTE, 2013).

Os primeiros ensaios de atividade do extrato EtOH de *P. acuminatus* e da lignana Justicidina B sobre *Leishmania amazonensis* demonstraram uma significativa atividade antileishmania. A atividade da Justicidina B foi considerada leishmaniostática e leishmanicida, pois, além de inibir o crescimento dos parasitos, em maiores concentrações causou morte celular. Outras lignanas e neolignanas já têm sido descritas por possuírem atividade antileishmania (BARATA et al., 2000; AVENIENTE et al., 2007; MONTE-NETO et al., 2007; CHOWDHURY et al., 2012; NÉRIS et al., 2013;

SAHA et al., 2013). A lignana Nirantina isolada de *Phyllanthus amarus* possui atividade antileishmania contra formas promastigotas, causando eventos apoptóticos, e inibindo crescimento de formas amastigotas intracelulares (CHOWDHURY et al., 2012). 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 contra formas promastigotas de *L. donovani* (BARATA et al., 2000).

O grupo de pesquisa do Laboratório de leishmanioses DBM/UFPB investigou atividade da lignana Iangambina, a qual demonstrou atividade antileishmania inibindo o crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* (MONTE-NETO et al., 2007). As neolignanas Burchelina e Grandisina apresentaram atividade antileishmania quando testadas contra formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. chagasi* (CALDAS, 2010). De forma semelhante, a neolignana Licarina A possui atividade antileishmania contra formas promastigotas de *L. major* induzindo a fragmentação do DNA, tipicamente observado em morte causada por apoptose, bem como, mostrou-se ativa contra formas amastigotas intracelulares (NÉRIS et al., 2013).

Até o momento não existem publicações científicas que relatem atividade antileishmania da lignana Justicidina B. Entretanto há registros na literatura das diversas atividades biológicas desempenhadas pela Justicidina B. Vasilev e colaboradores (2006) demonstraram pela primeira vez que a Justicidina B causou eventos apoptóticos em células de linhagem leucêmica linfóide crônica (SKW -3) quando tratadas com 0,25 e 0,5 μ M, e também inibiu proliferação de células malignas de forma semelhante à droga de referência etoposídeo. Justicidina B também induz apoptose em linhagens de células leucêmicas humanas (K562) dependente da ativação da via das caspases (LUO et al., 2014). Além das atividades descritas acima, a Justicidina B também demonstrou atividade contra protozoários da mesma família do gênero *Leishmania* (Trypanosomatidae), inibindo formas tripomastigotas de *Trypanosoma brucei rhodense* e *Trypanosoma cruzi* resultando em CI_{50} de 0,2 μ g/mL e 2,6 μ g/mL respectivamente (GERTSCH et al., 2003).

Além da atividade antileishmania também se investigou a citotoxicidade do extrato EtOH de *P. acuminatus* e da Justicidina B frente a macrófagos murinos. O

índice de seletividade para as duas substâncias foi determinado e observou-se que o EtOH de *Phyllanthus acuminatus* é igualmente citotóxica para o parasita e para a célula de mamífero. Dessa forma, o extrato EtOH não se qualifica como uma amostra alvo de investigações dessa atividade antileishmania. Por outro lado, a lignana Justicidina B demonstrou uma maior toxicidade para a célula do parasito do que para a célula de mamífero, gerando um índice de seletividade de 4,68. Com base nesses resultados, a lignana Justicidina B foi a molécula de escolha neste trabalho para aprofundar a investigação da sua atividade antileishmania.

As drogas de referência utilizadas nos testes de atividade antileishmania foram o Glucantime[®] e a Anfotericina B[®]. Nos ensaios de atividade antileishmania contra formas promastigotas de *L. amazonensis*, a Justicidina B apresentou-se mais eficaz do que o Glucantime[®], que só apresentou atividade contra formas promastigotas em altas concentrações. Ação já esperada, pois existem relatos na literatura documentando que as formas promastigotas são pouco sensíveis ao Glucantime[®] (OUELLETTE et al., 2004; CROFT et al., 2006). Já em comparação com a Anfotericina B[®], a lignana Justicidina B mostrou-se menos eficaz. A Anfotericina B[®] foi capaz de inibir o crescimento de formas promastigotas em concentrações de 0,1 µg/mL. Os resultados obtidos neste trabalho confirmam os dados encontrados na literatura para a sensibilidade de formas promastigotas à Anfotericina B[®] (SAHA et al., 1986; ESCOBAR et al., 2002). O Glucantime[®] foi a droga de referência utilizada na avaliação da citotoxicidade frente a macrófagos murinos, o qual apresentou CC₅₀ de 9420 µg/mL, resultando-se em um Índice de Seletividade de 0,39, demonstrando que o mesmo é mais tóxico para as células de mamífero do que para o parasita.

Com intuito de investigar possíveis mecanismos de ação relacionados à atividade antipromastigota da Justicidina B, investigou-se se essa lignana em diferentes concentrações estaria causando morte por apoptose em formas promastigotas de *L. amazonensis*. Sabe-se que a exposição à 4mM de H₂O₂ é responsável por causar morte por apoptose em formas promastigotas de *Leishmania donovani*. Condensação nuclear e perda do volume celular são características apresentadas nesse tratamento (DAS, et al., 2001). A fragmentação demonstrada pela Justicidina B foi semelhante à fragmentação observada no controle (H₂O₂) em todas as concentrações avaliadas, especialmente quando as formas promastigotas foram tratadas com 4x IC₅₀ da

Justicidina B. Dessa forma, pode-se inferir que o mecanismo de morte provocado pela Justicidina B pode ser o mesmo provocado pelo H_2O_2 .

O sucesso no desenvolvimento das formas amastigotas axênicas é relevante, especialmente, pela dificuldade nessa conversão e por permitir o estudo dessa forma do ciclo de vida do parasita (SAAR et.al., 1998). A transformação de formas promastigotas em formas amastigotas axênicas *in vitro* foi satisfatória pela metodologia utilizada (HODGKINSON et al., 1996), tendo eficácia comprovada pela infectividade e manutenção da infecção em macrófagos após 72 horas da infecção. Contudo, a infecção com formas promastigotas foi escolhida para a continuação dos ensaios de infecção por apresentar um melhor índice de infecção quando comparado ao índice de infecção apresentado pelas formas amastigotas axênicas.

Em relação à atividade da Justicidina B sobre macrófagos murinos infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis*, observou-se uma diminuição da porcentagem de macrófagos infectados com os tratamentos com essa lignana, bem como, diminuição do número de amastigotas por macrófago infectado. A diminuição desses dois parâmetros avaliados refletiu em uma diminuição considerável do índice de infecção dos macrófagos tratados com a Justicidina B em relação aos macrófagos não tratados (controle). Também foi avaliada a atividade da droga de referência Glucantime[®] sobre formas amastigotas intracelulares. Após o tratamento dos macrófagos peritoneais com essa droga observou-se uma atividade antiamastigota maior do que a atividade observada para as formas promastigotas. Esse resultado que confirma dados descritos na literatura, nos quais o Glucantime[®] atuaria como uma pró-droga que, só teria atividade contra *Leishmania* ao entrar na célula hospedeira, atravessar a membrana fagolisossomal e atuar contra amastigotas intracelulares (OUELLETTE et al., 2004). Contudo, foi observado que a Justicidina B apresentou uma maior atividade para as formas amastigotas intracelulares do que o Glucantime[®].

Para avaliar se atividade antiamastigota da Justicidina B sobre *L. amazonensis* poderia estar relacionada a uma atividade imunomoduladora desempenhada por essa molécula sobre macrófagos peritoneais murinos, investigou-se se a Justicidina B estaria modulando a produção das citocinas IL-12, IL-6 e IL-10, bem como a produção da molécula leishmanicida NO.

A citocina IL-12, uma molécula pró-inflamatória, é produzida por diferentes tipos celulares, como células NK, macrófagos e células polimorfonucleares. Em modelo murino infectado com *L. major* essa citocina está envolvida em uma resposta imune do tipo Th1, relacionados a um perfil de resistência a infecção (GUMY et al., 2004). Essa citocina é responsável por ativação de macrófagos, pois a IL-12 está envolvida na produção de INF- γ , o que leva a produção de NO e espécies reativas de oxigênio (ROS) em macrófagos, levando a uma proteção contra *Leishmania* (AWASTHI et al., 2004). Também em modelo murino é relatada uma significativa diminuição de IL-12 na presença de infecção causada por *L. amazonensis*, o que poderia ser correlacionado com a suscetibilidade a esta infecção (revisado por PEREIRA; ALVES, 2008). No presente trabalho, os níveis de IL-12 não se mostraram alterados na presença do tratamento com a lignana Justicidina B quando comparados com os níveis produzidos pelo controle, demonstrando que o mecanismo que envolve a diminuição da infecção em macrófagos infectados com *L. amazonensis* não está relacionando com essa citocina.

Interleucina -6 (IL-6) é uma citocina produzida por diferentes tipos celulares, dentre eles, macrófagos, células dendríticas e Linfócitos T e B (DIEHL; RINCÓN, 2002). É relatado que a presença da IL-6 promove uma diferenciação do tipo Th2 (MUNEGOWDA, et al., 2012), bloqueia diretamente a via de sinalização de INF- γ , e dessa forma, impede a formação uma resposta Th1. Enquanto a diferenciação para Th2 por IL-6 é dependente da produção de IL-4, a inibição do fenótipo Th1 por IL-6 independe da citocina IL-4 (DIEHL; RINCÓN, 2002).

Em modelo *in vivo* de leishmaniose experimental, IL-6 apresenta divergências quanto ao seu papel, algumas vezes relacionada a respostas de susceptibilidade (MOSKOWITZ et al., 1997; MURRAY, 2008) e outras essa correlação não é observada (TITUS et al., 2001). Estudos demonstram que a citocina IL-6 pode agir como um regulador negativo da imunidade leishmanicida, já que camundongos BALB/c “knockout” para IL-6 exibem maior resistência à infecção por *L. major*, dessa forma IL-6 desempenha um papel negativo no controle da infecção (MOSKOWITZ et al., 1997). Também observou-se que IL-6 é capaz de inibir atividade leishmanicida de macrófagos *in vitro* por mecanismos dependentes de oxigênio. Observou-se que a IL-6 interfere na atividade leishmanicida induzida por IFN- γ e TNF- α , visto que macrófagos pré tratados

com IL-6 e infectados com *Leishmania amazonensis* não apresentaram atividade leishmanicida quando estimulados com IFN- γ e TNF- α (HATZIGEORGIOU et al., 1993). Por outro lado, em modelo murino utilizando camundongos Balb/c infectados com *L. major*, observou-se que não houve diferença no curso da infecção quando utilizou-se camundongos “knockout” para IL-6 quando comparados a camundongos selvagens (TITUS et al., 2001). Também foi observada a produção da citocina IL-6 na infecção de macrófagos peritoneais murinos de camundongos C57/BL6, conhecidos por apresentar resistência à infecção por *Leishmania major* (FILARDY et al., 2014). A Justicidina B não foi capaz de alterar a síntese de IL-6 por macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados *in vitro* com diferentes concentrações dessa lignana. Esses resultados mostram que a atividade anti-mastigota para *L. amazonensis* da Justicidina B, observada no presente estudo, não está correlacionada com a síntese de IL-6.

A importância da citocina IL-10, uma citocina anti-inflamatória secretada por macrófagos, células dendríticas e linfócitos T, está comumente relacionada à suscetibilidade na infecção por *Leishmania* sp. em modelos de leishmaniose experimental (AWASTHI et al., 2004). Estudos demonstram o envolvimento de IL-10 com a inibição da resposta Th1 durante a fase aguda da infecção por *L. amazonensis* em modelo murino (JONES et al., 2002).

Experimentos com camundongos BALB/c deficientes em IL-10 demonstraram que esses animais embora não capazes de conter a infecção por *L. amazonensis* apresentaram um aumento na produção de NO e expressão de RNAm de IL-12p40 e IL-12R β_2 , quando comparados com camundongos selvagens (PADIGEL et al., 2003). Também foi demonstrado que após o tratamento com anticorpos anti-IL-4, camundongos deficientes em IL-10 controlaram eficazmente a infecção e diminuíram a carga parasitária nas lesões, mostrando que IL-10 juntamente com IL-4 modulam a suscetibilidade à infecção por inibir o desenvolvimento de uma resposta Th1 (SACKS; ANDERSON, 2004). Portanto, no presente estudo, foi observado que a diminuição do índice de infecção dos macrófagos infectados com *L. amazonensis*, após o tratamento com a lignana Justicidina B, está relacionada a uma atividade imunomoduladora da Justicidina B associada à diminuição dos níveis dessa citocina. A IL-10 tem sido conhecida por suprimir a expressão de iNOS e reduzir a produção de NO em vários

tipos celulares (BECHEREL et al., 1995; EYLER et al, 1997). Huang e colaboradores (2002) observaram que IL-10 inibe a formação de NO em macrófagos estimulados com LPS devido a diminuição da expressão da iNOS. A diminuição na síntese de IL-10 observada, no presente trabalho, pode estar associada a expressão da iNOS desses macrófagos levando a produção da molécula leishmanicida NO.

Sabe-se que a produção de óxido nítrico (NO) é crítica na defesa contra patógenos intracelulares, dessa forma, na infecção por *Leishmania sp.* atuando como um agente leishmanicida (OLEKHNOVITC et al., 2014). Neste trabalho foi possível observar que a análise dos sobrenadantes dos macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com 10 e 20µg/mL da Justicidina B após 72h de tratamento com essa lignana induziu um aumento da síntese de NO de forma semelhante aos macrófagos tratados com LPS. É documentado que o lipopolissacarídeo (LPS), uma endotoxina de bactérias gram-negativas, leva a uma série de respostas em macrófagos, inclusive a estimulação da produção de NO (HIKOSAKA et. al., 2006). Portanto, no presente trabalho, pode-se inferir que o efeito antiamastigota da Justicidina B é devido a uma diminuição da síntese de IL-10, que por sua vez, permitirá em uma maior expressão de iNOS e conseqüentemente uma maior síntese de NO, sendo esse o responsável pela redução da infecção de macrófagos com *L. amazonensis*.

6 CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

O extrato etanólico, a fase diclorometano, o Hiptenolideo isolados de *Hyptis macrostachys*, bem como o extrato etanólico de *Phyllanthus acuminatus* apresentaram atividade antileishmania contra formas promastigotas de *L. amazonensis*, porém essas substâncias apresentaram baixo índice de seletividade. A lignana Justicidina B apresentou atividade antileishmania (leishmanioestática e leishmanicida) sobre formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* apresentando uma menor citotoxicidade para macrófagos peritoneais murinos. Observou-se que a Justicidina B foi capaz de fragmentar o DNA de formas promastigotas de *L. amazonensis* de maneira semelhante ao H_2O_2 , conhecido por induzir apoptose em *Leishmania* spp.

Verificou-se que a lignana Justicidina B possui atividade antiamastigota *in vitro* no modelo de infecção macrófagos murinos com *L. amazonensis*, observados através da redução da porcentagem de macrófagos infectados, do número de amastigotas por macrófago infectado e do índice de infecção. Esse resultado foi correlacionado com uma atividade imunomoduladora dessa lignana, associada à diminuição nos níveis de interleucina (IL)-10, e a um aumento nos níveis de óxido nítrico (NO). Pode-se concluir que a lignana Justicidina B possui uma significativa atividade antipromastigota e antiamastigota e apresenta propriedades imunomodulatórias em modelos de infecção *in vitro*.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

- AFONSO, L. C.; SCOTT, P. Immune responses associated with susceptibility of C57BL / 10 mice to *Leishmania amazonensis*. **Infection and Immunity**, V. 61, n. 7, p. 2952 – 2959, 1993.
- AGA, E.; KATSCHINSKI, D. M.; VAN ZANDBERGEN, G.; LAUFS, H.; HANSEN, B.; KERSTIN MÜLLER, K.; WERNER SOLBACH, W.; LASKA, T. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. **J. Immunol.** V169, p.898 – 90, 2002.
- AGRA, M. F.; FREITAS, P. F.; BARBOSA-FILHO J. M. Synopsis of the plants known as medicinal and poisonous in Northeast of Brazil. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. V.17, n. 1, p.114-140, 2007.
- AMATO, V.S.; TUON, F.F.; SIQUEIRA, A.M. NICODEMO, A. C.; NETO, V.A. Treatment of mucosal leishmaniasis in Latin America: systematic review. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** V.77, p. 266–274, 2007.
- ANDRADE, B. B.; 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.
- ARNOLD, A. M.; WHITEHOUSE, J. M.A. Etoposide: A new anti-cancer agent. Occasional Survey. **The Lancet**.1981.
- ASANO, J.; CHIBA, K.; TADA, M.; YOSHII, T. Antiviral activity of lignans and their glycosides from *Justicia procumbens*. **Phytochemistry**. V.42, p.713–717, 1996.
- 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. Review Article. **Indian J Med Res**. V. 119, p. 238-258, 2004.

AZEREDO-COUTINHO, R.B.G.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; SCHUBACH, A.; CUPOLILLO, E.; QUINTELLA, L.P.; MADEIRA, M.F.; PACHECO, R.S.; VALETE-ROSALINO, C. M.; MENDONÇA, S. C. F. First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. V.101, p. 735—737, 2007.

BAIDOURI, F. E.; DIANCOURT, L.; BERRY, V.; CHEVENET, F.; PRATLONG, F.; MARTY, P.; RAVE, C. Genetic Structure and Evolution of the *Leishmania* Genus in Africa and Eurasia: What Does MLSA Tell Us. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. V. 7, I.6, p. e2255, 2013.

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

BASÍLIO, I. J. L.; AGRA, M. F.; ROCHA, E. A.; LEAL, C. K. A.; ABRANTES, H.F. Estudo Farmacobotânico Comparativo das Folhas de *Hyptis pectinata* (L.) Poit. e *Hyptis suaveolens* (L.) Poit. (Lamiaceae). **Acta Farm. Bonaerense**. V. 25, n. 4, p. 518-525, 2006.

BASSELIN, M.; DENISE, H.; COOMBS, G.H.; BARRETT, M.P. Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 46, 3731–3738, 2002.

BATES P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **national Journal for Parasitology**. V. 37, p.1097–1106, 2007.

BATES, P. A.; ROGERS, M. E. New Insights into the Developmental Biology and Transmission. Mechanisms of *Leishmania*. **Current Molecular Medicine**. V. 4, p. 601-609, 2004.

BECHEREL, P. A., LE GOFF, L., KTORZA, S., OUAAZ, F., MENCIA- HUERTA, J. M., DUGAS, B., DEBRE, P., MOSSALAYI, M. D., AND AROCK M. Interleukin-10 inhibits IgE-mediated nitric oxide synthase induction and cytokine synthesis in normal human keratinocytes. *Eur. J. Immunol.* V. 25, p. 2992–2995, 1995.

BERMAN, J. D.; GALLALEE, J.V.; BEST, J.M. 1987. Sodium stibogluconate (Pentostam) inhibition of glucose catabolism via the glycolytic pathway, and fatty acid beta-oxidation in *Leishmania mexicana* amastigotes. *Biochem. Pharmacol.* V.36, p.197–201, 1987.

BERN, C.; MAGUIRE, J.H.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis.* V. 2, p.e313, 2008.

BRASIL. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral** / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde – 1. ed., 5. reimpr. – Brasília: Ministério da Saúde. p.120, 2013.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 120p, 2006.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2. ed. atual. – Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 180p, 2007.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**, Brasília-DF, 2ª edição, p. 17-24 e 145, 2010a.

BURCHMORE, R. J.S.; BARRETT, M. P. Life in vacuoles – nutrient acquisition by *Leishmania* amastigotes. *International Journal for Parasitology*. V.31,p. 1311–1320, 2001.

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

CALLAHAN, H.L.; PORTAL, A.C.; DEVEREAUX, R.; GROGL, A. An Axenic Amastigote System for Drug Screening. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, V. 41, n.4, p. 818-822, 1997.

CÉLINE, V.; ADRIANA, P.; ERIC, D.; JOAQUINA, A.; YANNICK, E.; AUGUSTO, L. F.; ROSARIO, R.; DIONICIA, G.; MICHEL, S.; DENIS, C.; GENEVIÈVE, B. Medicinal plants from the Yanasha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. **Journal of Ethnopharmacology**. V. 123, p.413–422, 2013.

CERRATO, L.; VALERI, A.; BUEREN, J. A.; ALBELLA, B. In vitro sensitivity of granulo-monocytic progenitors as a new toxicological cell system and endpoint in the ACuteTox Project. **Toxicology and Applied Pharmacology**. V. 238, p.111–119, 2009.

CHAGALUKA, G.; STANLEY, C.; BANDA, K.; DEPANI, S.; NIJRAM'MADZI, J.; KATANGWE, T.; ISRAELS, T.; BAILEY, S.; MUKAKA, M.; MOLYNEUX, E. Kaposi's sarcoma in children: An open randomised trial of vincristine, oral etoposide and a combination of vincristine and bleomycin. **European Journal of Cancer**. V. 50, p.1472–1481, 2014.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. **Nature review microbiology**. V.5, p873, 2007.

CHOWDHURY, S.; MUKHERJEE, T.; MUKHOPADHYAY, R.; MUKHERJEE, B.; SENGUPTA, S.; CHATTOPADHYAY, S.; JAISANKAR P.; ROY S.; MAJUMDER, H.K. The lignan niranthin poisons *Leishmania donovani* topoisomerase IB and favours a Th1 immune response in mice. **EMBO Molecular medicine**. V.4, p.1126–1143, 2012.

COELHO, A. C.; GENTIL, L.G.; SILVEIRA, J.F.; COTRIM P. C. Characterization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes resistant to pentamidine. **Experimental Parasitology**. V. 120, p.98–102, 2008.

CONTEH, L.; ENGELS, T.; MOLYNEUX, D.H. Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. **Lancet**. V.375, p.239–247, 2010.

COOMBS, G.H.; CRAFT, J.A.; HART, D.T. A comparative study of *Leishmania mexicana* amastigotes and Promastigotes. Enzyme activities and subcellular locations. **Molecular and Biochemical Parasitology**. V. 5, p.199-211, 1982.

COSTA, V. C. O.; TAVARES, J. F.; SILVA, A.B.; DUARTE, M.C.; AGRA, M. F.; BARBOSA-FILHO, J. M.; SOUZA, I. L. L.; SILVA, B.A.; SILVA, M.S. Hyptenolide, a new α -pyrone with spasmolytic activity from *Hyptis Macrostachys*. **Phytochemistry Letters**. V. 8 p. 32–37, 2014.

COSTA, V. C. O.; TAVARES, J. F.; SILVA, A.B.; QUEIROGA, C.S.; SILVA-FILHO, R.N.; DUARTE, M. C.; SILVA, M.S. Hyptenol, um novo diterpeno labdano de *Hyptis macrostachys* Benth. **33ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química**. 2010.

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

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. **Histol Histopathol**. V. 18, N.4, p. 1059-1065, 2003.

DAR, A.A.; ARUMUGAM, N. Lignans of Sesame: Purification Methods, Biological Activities and Biosynthesis - a Review. **Bioorganic Chemistry**. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bioorg.2013.06.009>. 2013.

DAS, M.; MUKHERJEE, S. B. and SHAHA, C. Hydrogen peroxide induces apoptosislike death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Journal of Cell Science**. V.114, n.13, p.2461-2469, 2001.

DAVID, C.V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatologic Therapy**. V. 22, p. 491–502, 2009.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious**. V.27, p.305-318, 2004.

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

DUARTE, S.L.F. **Constituintes químicos de *Phyllanthus acuminatus* vahl (phyllanthaceae): Isolamento, caracterização estrutural e atividades biológicas**. 2013, 115p. Dissertação de Mestrado (Mestrado em Produtos Naturais e sintéticos Bioativos) – Centro de Ciências da Saúde-CCS, Universidade Federal da Paraíba.

ESCOBAR, P.; MATU, S.; MARQUES, C.; CROFT, S.L. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocholine (miltefosine), ET-18- OCH(3) (edelfosine) and amphotericin B. **Acta Trop.** V.81, p.151–157, 2002.

EVANS, S. M.; CASARTELLI, A.; HERREROS, E.; MINNICK, D. T.; DAY, C.; GEORGE, E.; WESTMORELAND, C. Development of a high throughput *in vitro* toxicity screen predictive of high acute *in vivo* toxic potential. **Toxicology in Vitro.** V.15, p. 579–584, 2001.

EXTENSIO - **Revista Eletrônica de Extensão.** SERVIÇO DE INFORMAÇÕES SOBRE PLANTAS MEDICINAIS E MEDICAMENTOS FITOTERÁPICOS, n.2, 2005.

FALCÃO, D. Q.; MENEZES, F. S. Revisão etnofarmacológica, farmacológica e química do gênero *Hyptis*. The *Hyptis* genus: an ethnopharmacological and chemical review. **Rev. Bras. Farm.** V. 84, n. 3, p. 69-74, 2003.

FILARDY, A. A.; COSTA-DA-SILVA, A. C.; KOELLER, C. M.; GUIMARÃES-PINTO, K.; RIBEIRO-GOMES, F.L.; LOPES, M. F.; HEISE, N.; FREIRE-DE-LIMA, C.G.; NUNES, M. P.; DOSREIS, G. A. Infection with *Leishmania major* Induces a Cellular Stress Response in Macrophages. **PLoS ONE.** V.9, I. 1, 2014.

GERTSCH, J.; TOBLER, R.T.; BRUN, R.; STICHER, O.; HEILMANN, J. Antifungal, Antiprotozoal, cytotoxic and piscicidal proprieties of Justicidin B and a new Arylnaphthalide lignan from *Phyllanthus piscatorium* . **Planta med.** V. 69, p. 420-424, 2003.

GODINHO, J. L.P.; SIMAS-RODRIGUES, C.; SILVA, R.; ÜRMENYIC, T.P.; SOUZA, W.; FERNANDES, J. C.; Rodrigues Efficacy of miltefosine treatment in *Leishmania amazonensis* infected BALB/c mice. **International Journal of Antimicrobial Agents.** V. 39. p. 326-331, 2012.

GORDALIZA, M.; CASTRO, M.A.; CORRAL, J.M.; FELICIANO, A.S. Antitumor properties of podophyllotoxin and related compounds. **Curr Pharm Des.** V. 6, p. 1811-1839, 2000.

GOSSAGE, S.M. ROGERS, M.E.; BATES, P. A et al. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **Int. J. Parasitol.** V. 33, p. 1027–1034, 2003.

GOTO, H.; LINDOSO, J.A.L. Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. **Infect Dis Clin.** n. 26, p. 293-307, 2012.

GOTTLEB, O.R.; YOSHIDA, M. **Lignóides com atenção especial à química das neolignanas. Química Nova.** p. 250-273, 1984.

GOUN, E.; CUNNINGHAM, G; CHU, D.; NGUYEN, C.; MILES, D. Antibacterial and antifungal activity of Indonesian ethnomedical plants. **Fitoterapia**, V.74, n.6, p.592-596, 2003.

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.

GUERRA, J. A.; PRESTES, S.R.; SILVEIRA, H.; COELHO, L.I.; GAMA, P.; MOURA, A.; AMATO, V.; BARBOSA, M.G.; FERREIRA, L.C. Mucosal Leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* and *Leishmania (Viannia) guyanensis* in the Brazilian Amazon, **PLoS Negl. Trop. Dis.** V.5, p. 980, 2011.

GUMY, A.; LOUIS, J. A.; LAUNOIS, P. The murine model of infection with *Leishmania major* and its importance for the deciphering of mechanisms underlying differences in Th cell differentiation in mice from different genetic backgrounds. **International Journal for Parasitology**. V. 34, p. 433–444, 2004.

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. **J. Immunol.** V. 151, p. 3682–3692, 1993.

HAWORTH, R. D. **J. Chem. Soc.** p. 448, 1942.

HEPBURN, N.C., SIDDIQUE, I., HOWIE, A.F., BECKETT, G.J., HAYES, P.C. Hepatotoxicity of sodium stibogluconate therapy for American cutaneous leishmaniasis. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** V. 88, p. 453–455, 1994b.

HIKOSAKA, K.; KOYAMA, Y.; MOTOBU M.; YAMADA, M.; NAKAMURA, K.; KOGE, K.; SHIMURA, K.; ISOBE, T.; TSUJI, N.; KANG, C-B.; HAYASHIDANI, H.; WANG, P-C.; MATSUMURA, M.; HIROTA, Y. Reduced Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Nitric Oxide Production in Peritoneal Macrophages and Inhibited LPS-Induced

Lethal Shock in Mice by Sugar Cane (*Saccharum officinarum* L.) Extract. **Biosci. Biotechnol. Biochem.** v.12(70), p.2853-2858, 2006.

HIMES, R.H.; KERSEY, R.N.; HELLER-BETTINGER, I.; SAMSON, F.E. Action of the Vinca Alkaloids Vincristine, Vinblastine, and Desacetyl Vinblastine Amide on Microtubules in Vitro. **CANCER RESEARCH.** V.36, p.3798-3802, 1976.

HODGKINSON, V. H.; SOONG, L.; DUBOISE, S. M.; MCMAHON-PRATT, D. *Leishmania amazonensis*: Cultivation and Characterization of Axenic Amastigote-like Organisms. **Experimental parasitology.** V.83, n. 53, p.94-105, 1996.

HUANG, C-J.; STEVENS, B.R; NIELSEN, R. B.; SLOVIN, P.N.; FANG, X.; NELSON, D. R.; SKIMMING, J.W. Interleukin-10 Inhibition of Nitric Oxide Biosynthesis Involves Suppression of CAT-2 Transcription. **NITRIC OXIDE: Biology and Chemistry.** V. 6, N. 1, p. 79–84, 2002.

HUANG, S.T.; PANG, J-H. S.; YANG, R-C. Anticancer Effects of *Phyllanthus urinaria* and Relevant Mechanisms. **Chang Gung Med J.** V.33, N.5, p.477-8, 2012.

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

JEENA, K. J.; JOY, K. L.; KUTTAN, R. Effect of *Emblica officinalis*, *Phyllanthus amarus* and *Picrorrhiza Kurroa* on N-nitrosodiethylamine induced hepatocarcinogenesis. **Cancer Lett.** V.136, p.11-16, 1999.

Jl, 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, n. 8, p. 4278-4288, 2003.

JOCHIM, R.C.; TEIXEIRA, C. *Leishmania* commandeers the host inflammatory response through neutrophils. **Trends in Parasitology.** V. 25, n 4, p.145–147, 2009.

JONES, D. E.; ACKERMANN, M. R.; WILLE, U.; HUNTER, C. A.; SCOTT, P. Early Enhanced Th1 Response after *Leishmania amazonensis* Infection of C57BL/6 Interleukin-10-Deficient Mice Does Not Lead to Resolution of Infection. **INFECTION AND IMMUNITY.** V. 70, N. 4, p. 2151–2158, 2002.

JOSEPH, H.; GUN, J.; MOWS C.; MENSAH, L.J.; ROUSAKIS,C.; GRATAS, C. JUSTICIDIN B, A CYTOTOXIC PRINCIPLE FROM JUSTICIA PECTORALIS. **Journal of Natural Products**. V.51, n. 3, p. 599-600, 1988.

KAMHAWI, S. Phlebotomine sand flies and Leishmania parasites: friends or foes? **TRENDS in Parasitology**. V.22, N.9, 2006.

KAYSER, O.; KIDERLE, A. F.; CROFT, S.L. Antileishmanial activity of two γ -pyrones from *Podolepis hieracioides* (Asteraceae). **Acta Tropica**. V. 86, p.105-107, 2003.

KONU KLUGIL, B.; IONKOVA, I.; VASILEV, N.; SCHMIDT, T.J.; WINDHÖVEL, J.; FUSS, E.; ALFERMANN, A. W. Lignans from *Linum* species of sections Syllinum and Linum. **Nat Prod Res** V. 21, p. 1–6, 2007.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. Evolution classification and geographical distribution. In: The Leishmaniasis in Biology and Medicine (W . Peters and R. Killick Kendrick Ed.) **Academic Press Inc.**, London, 1987.

LAOUAR, Y.; SUTTERWALA, F.S.; GORELIK, L.; FLAVELL, R.A. Transforming growth factor- β controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon- γ . **Nature Immunology**. V. 6, n. 6, p. 600-607, 2005

LASKAY, T.; ZANDBERGEN, G.V.; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes – Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes?. **TRENDS in Microbiology**. Vol.11, N.5, 2003.

LIMA, A.C.B.; PAIXÃO, M.S.; MELO, M.; SANTANA, M. T.; DAMASCENA, N. P.; DIAS, A.S.; PORTO, Y.C.B.S. ; FERNANDES, X. A.; SANTOS, C. C. S.; LIMA, C.A.; QUINTANS-JÚNIOR, L.J.; ESTEVAM, C.S.; ARAÚJO, B.S. Orofacial antinociceptive effect and antioxidant properties of the hydroethanol extract of *Hyptis fruticosa* salmz ex. Benth. **Journal of Ethnopharmacology**. v. 146, p. 192–197, 2013.

LOCKSLEY, R.M.; HEINZEL, F.P.; SADICK, M.D.; HOLADAY, B.J.; GARDNER, K.D. Murine cutaneous leishmaniasis: susceptibility correlates with differential expansion of helper T cell subset. Ann. Inst. Pasteur/ **Immunol**. V.138, p.744–749, 1987.

LUO, J.; HU, Y.; KONG, W.; YANG, M. Evaluation and Structure-Activity Relationship Analysis of a New Series of Arylnaphthalene lignans as Potential Anti-Tumor Agents. **PLoS ONE** 9(3): e93516. doi:10.1371/journal.pone.0093516, 2014.

LUX, H.; HEISE, N.; KLENNER, T.; HART, D.; OPPERDOES, F.R. Ether-lipid (alkyl-phospholipid) metabolism and the mechanism of action of ether-lipid analogues in *Leishmania*. **Mol. Biochem. Parasitol.** V.111, p.1–14, 2000.

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

MAÜEL, J.; BETZ-CORRADIN, S.; BUCHMÜLLER ROUILLER, Y. Nitrogen and oxygen metabolites and the killing of *Leishmania* by activated murine macrophages. **Res. Immunol.** V.142, p.577–580, 1991.

MCGWIRE, B.S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. **QJ Med.** doi:10.1093/qjmed/hct116. 2013.

MCNEIL, M.; FACEY, P.; PORTER, R. Essential oils from the *Hyptis* genus- a review (1909-2009). **Natural product communications.** V. 6, n. 11, p. 1775-1796, 2011.

MENTEN, P.; WUYTS, A.; VAN DAMME, J. Survey Macrophage inflammatory protein-1. **Cytokine & Growth Factor Reviews.** V. 13, p. 455–481, 2002.

MOHAGHEGHZADEH, A.; SCHMIDT, T. J.; ALFERMANN, A.W. Arylnaphthalene Lignans from in Vitro Cultures of *Linum austriacum*. **J. Nat. Prod.** V. 65, p. 69-71, 2002.

MONTE NETO, R.L.; BARBOSA-FILHO, J.M.; SOUSA, L.M.A.; ATHAYDE FILHO, P.F.; DIAS, C.S.; OLIVEIRA, M. R. Crude Ethanolic Extract, Lignoid Fraction and Yangambin from *Ocotea duckei* (Lauraceae) Show Antileishmanial Activity. **Z. Naturforsch.** V. 62c, p. 348- 352, 2007.

MONTE-NETO, R.L.; SOUSA, 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). **Z. Naturforsch.** V. 63c, p. 681-686, 2008.

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, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. **Immunological Reviews**. V. 240, p. 286–296, 2011.

MUKHERJEE, A.; PADMANABHAN, P.K.; SAHANI, M.H.; BARRETT, M.P.; MADHUBALA, R. Roles for mitochondria in pentamidine susceptibility and resistance in *Leishmania donovani*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. V.145, p. 1–10, 2006.

MUNAKATA, K.; MARUMO, S.; OHTA, K. Tetrahedron letters The syntheses of Justicidin b and related compounds. **Pergamon Press Ltd**. Printed in Great Britain. N.39, p. 3821-3825, 1967.

MUNEGOWDA, M. A.; XU, S.; FREYWALD, A.; XIANG, J. CD4⁺ Th2 cells function alike effector Tr1 and Th1 cells through the deletion of a single cytokine IL-6 and IL-10 gene. **Molecular Immunology**. V.51, p. 143– 149, 2012.

MUÑOZ, V.; SAUVAIN, M.; BOURDY, G.; CALLAPA, J.; BERGERON, S.; ROJAS, I.; BRAVO, J. A.; BALDERRAMA, L.; ORTIZ, B.; GIMENEZ, A.; DEHARO, E. The search for natural bioactive compounds through a multidisciplinary approach in Bolivia. Part II. Antimalarial activity of some plants used by Mosetene indians. **Journal of Ethnopharmacology**, V.69, p.139-155, 2000.

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.

NÉRIS, P. L. N. **NEOLIGNANA LICARINA A: INVESTIGAÇÃO DA ATIVIDADE BIOLÓGICA SOBRE *LEISHMANIA* sp.** 2012. Dissertação (Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa – PB, 2012).

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.

OLEKHNOVITCH, R.; RYFFEL, B.; MÜLLER, A. J.; BOUSS, P. Collective nitric oxide production provides tissue-wide immunity during *Leishmania* infection. **J Clin Invest.** V. 124, n.4, p. 1711–1722, 2014.

OLIVEIRA, L.F.; SCHUBACH, A.O.; MARTINS, M.M.; PASSOS, S.L.; OLIVEIRA, R.V.; MARZOCHI, M.C.; CARLOS A. ANDRADE, C.A. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica.** V. 118, p.87–96, 2011.

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

OUELLETTE, M.; DRUMMELSMITH, J.; PAPADOPOULOU, B. Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. **Drug Resistance Updates.** V.7, p. 257–266, 2004.

PADIGEL, U. M.; ALEXANDER, J.; FARRELL, J. P. The Role of Interleukin-10 in Susceptibility of BALB/c Mice to Infection with *Leishmania mexicana* and *Leishmania amazonensis*. **J Immunol.** V. 171, p. 3705–3710, 2003.

PARIS, C., LOISEAU, P.M., BORIES, C., BREARD, J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrob. Agents Chemother.** V. 48, p.852–859, 2004.

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, L.O.R.; BRANDÃO, A. An analysis of trypanosomatids kDNA minicircle by absolute dinucleotide frequency. **Parasitology International.** V. 62, p. 397–403, 2013.

PÉREZ-VICTORIA, F. J.; SÁNCHEZ-CAÑETE, M. P.; SEIFERT, K.; CROFT, S.L.; SUNDAR, S.; CASTANYS, S. Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: implications for clinical use. **Drug Resist Updat.** V.9, p. 26–39, 2006.

PETTIT, G.R.; CRAGG, G.M.; GUST, D.; BROWN, P.; SCHMIDT, J.M. The structures of phyllanthostatin 1 and phyllanthoside from the Central American tree *Phyllanthus acuminatus* Vahl. **CAN. J. CHEM.** V. 60, 1982.

PETTIT, G.R.; SCHAUFELBERGER, D.E.; NIEMAN, R.A.; DUFRESNE, C.; SAENZ-RENAULD, J.A. Antineoplastic agents, 177. Isolation and structure of phyllanthostatin. **J Nat Prod.** V.53, N.06, p.1406-1413, 1990.

PICKING, D.; DELGODA, R.; BOULOGNE, I.; MITCHELL, S. *Hyptis verticillata* Jacq: A review of its traditional uses, phytochemistry, pharmacology and toxicology. **Journal of Ethnopharmacology.** v. 147, p 16–41, 2013.

RANILLA, L.G.; KWON, Y-I.; APOSTOLIDIS, E.; SHETTY, K. Phenolic compounds, antioxidant activity and in vitro inhibitory potential against key enzymes relevant for hyperglycemia and hypertension of commonly used medicinal plants, herbs and spices in Latin America. **Bioresource Technology.** V.101, p.4676–4689, 2010.

REITHINGER, R.; DUJARDIN, J-C.; LOUZIR, H.; PIRMEZ, C.; ALEXANDER, B.; BROOKER, S. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infect Dis.** V.7, p. 581–96, 2007.

RIBEIRO, S.S.; JESUS, A.M.; ANJOS, C.S.; SILVA, T.B.; SANTOS, A.D.C.; JESUS, J.R.; MOACIR S. ANDRADE, M.S.; SAMPAIO, T.S.; GOMES, W. F.; ALVES, P. B.; CARVALHO, A. A.; PESSOA, C. P.; MORAES, M.O. ; PINHEIRO, M.L.B.; PRATA, A.P.N.; BLANK, A.F.; SILVA- MANN, R.; MORAES, V.R.S.; COSTA, E.V.C.; NOGUEIRA, P. C.L.; BEZERRA, D.P. Evaluation of the Cytotoxic Activity of Some Brazilian Medicinal Plants. **Planta Med.** V.78, p. 1601–1606, 2012.

RITTER, U.; FRISCHKNECHT, F.; VAN ZANDBERGEN, G. Are neutrophils important host cells for Leishmania parasites?. **Trends in Parasitology.** V.25, N.11, p. 505-510, 2009.

ROBERTS, W.L.; RAINEY, P.M. Antileishmanial activity of sodium stibogluconate fractions. Antimicrob. **Agents Chemother.** V37, p.1842–1846, 1993a.

RODRIGUES, M.L., COSTA, R.S., SOUZA, C.S., FOSS, N.T., ROSELINO, A.M. Nephrotoxicity attributed to meglumine antimoniate (Glucantime) in the treatment of generalized cutaneous leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo.** V. 41, p. 33–37, 1999.

SAAR, Y.; RANSFORD, A.; WALDMAN, E.; MAZAREB, S.; AMIN-SPECTOR, S.; PLUMBLEE, J.; TURCO, S.J.; ZILBERSTEIN, D. Characterization of developmentally regulated activities in axenic amastigotes of *Leishmania donovani*. **Molecular and Biochemical Parasitology**. V. 95, p. 9–20, 1998.

SACKS, D.; ANDERSON, C. Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of *Leishmania* infection in mice. **Immunological Reviews**. Vol. 20, p. 225–238, 2004.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nat Rev. Immunol.** V.2, p.845–858, 2002.

SAHA, A. K.; MUKHERJEE T.; BHADURI, A. Mechanism of action of amphotericin B on *Leishmania donovani* promastigotes. **Molecular and Biochemical Parasitology**. V. 19, p. 195–200, 1986.

SAHA, S.; MUKHERJEE, T.; CHOWDHURY, S.; MISHRA, A.; CHOWDHURY, S. R.; JAISANKAR, P.; MUKHOPADHYAY, S.; MAJUMDER, H. K. The lignan glycosides lyoniside and saracoside poison the unusual type IB topoisomerase of *Leishmania donovani* and kill the parasite both in vitro and in vivo. **Biochemical Pharmacology**. V.86, p.1673–1687, 2013.

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

SCHMIDT, T. J.; VÖßING, S.; KLAES, M.; GRIMME, S.; An Aryldihydronaphthalene Lignan with a Novel Type of Ring System and Further New Lignans from *Linum perenne* L. **Planta Med.** v.7, p.1574–1580, 2007.

SCHMIDT, T.J.; KHALID, S.A.; A.J. ROMANHA, A. J.; ALVES, T.M.A.; BIAVATTI, M. W.; BRUN, R.; COSTA, F.B.; CASTRO, S.L.; FERREIRA, V.F.; LACERDA, M.V.G; LAGO, J.H.G.; LEON, L.L.; LOPES, N.P.; AMORIM, R.C.N.; NIEHUES, M.; OGUNGBE, I.V.; POHLIT, A. M.; SCOTTI, M.T.; W.N. SOEIRO, S.M.N.C.; STEINDE, M.; TEMPONE, A.G. The Potential of Secondary Metabolites from Plants as Drugs or Leads Against Protozoan Neglected Diseases-Part II. **Current Medicinal Chemistry**. V. 19, n. 14, 2012.

SCOTT, P.; NATOVITZ, P.; COFFMAN, R.L.; PEARCE, E.; SHER, A. Immunoregulation of cutaneous leishmaniasis. T cell lines that transfer protective immunity or exacerbation belong to different T helper subsets and respond to distinct parasite antigens. **J. Exp. Med.** V.168, p.1675–1684, 1988.

SERENO, D.; CAVALEYRA, M.; ZEMZOUMI, K.; MAQUAIRE, S.; OUAISSI, A.; LEMESRE, J.L. Axenically grown amastigotes of *Leishmania infantum* used as an in vitro model to investigate the pentavalent antimony mode of action. *Antimicrob. Agents Chemother.* V. 42, p. 3097– 3102, 1998.

SERENO, D.; HOLZMULLER, P.; MANGOT, I.; CUNY, G.; OUAISSI, A.; LEMESRE, J. L. Antimonial-mediated DNA fragmentation in *Leishmania infantum* amastigotes. *Antimicrob. Agents Chemother.* V.45, p. 2064–2069, 2001.

SILVA, M. J. ; SALES, M.F.S. O gênero *Phyllanthus* L. (Phyllanthaceae – Euphorbiaceae Juss.) no bioma Caatinga do estado de Pernambuco – Brasil. *Rodriguésia*. V.55, N.84, p.101-126, 2004.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; GOMES, C.M.C.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.P. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L.(L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunology*. V.31, p. 423–431, 2009.

SOONG L. Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites. *J Immunol* V.180, p. 4355–4360, 2008.

SOUZA, I. L. L. S.; OLIVEIRA, G. A.; TRAVASSOS, R. A VASCONCELOS, L. H. C.; CORREIA, A. C. C.; MARTINS, I. R. R.; SANTOS-JÚNIOR, M. S. M.; COSTA, V. C. O.; TAVARES, J. F.; SILVA, M. S.; SILVA, B. A. Spasmolytic activity of *Hyptis macrostachys* Benth. (Lamiaceae). *J. Med. Plants Res.* Vol. 7, N.33, p. 2436 2443, 2013.

STROBER, W. Trypan Blue Exclusion Test of Cell Viability- APPENDIX 3B BASIC PROTOCOL. *Current Protocols in Immunology* A.3B.1-A.3B.2, 1997.

SUNDAR, S.; OLLIARO, P. L. Miltefosine in the treatment of leishmaniasis: clinical evidence for informed clinical risk management. *Ther Clin Risk Manag.* V.3, p.733 40, 2007.

SWIHART, K.; FRUTH, U.; MESSMER, N.; HUG, K.; BEHIN, R.; HUANG, S.; DEL GIUDICE, G.; AGUET, M.; LOUIS, J.A. Mice from a genetically resistant background lacking the interferon gamma receptor are susceptible to infection with *Leishmania* major but mount a polarized T helper cell 1-type CD4⁺ T cell response. *J. Exp. Med.* V.181, p.961–971, 1995.

TITUS, R. G.; DEKREY, G.K.; MORRIS, R.V.; SOARES, M. B. S. 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**. Vol. 69, No. 8, p. 5189–5192, 2001.

TIUMAN, T.S.; SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; DIAS FILHO, B.P.; NAKAMURA, C.V. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**. V.15, p.e525–e532, 2011.

TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immuneresponse to leishmania: paradox rather than paradigm. Minireview. **FEMS Immunol Med Microbiol**. V.51 p. 229–242, 2007.

VAN ZANDBERGEN, G.; HERMANN, N.; LAUFS, H.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. *Leishmania* promastigotes release a granulocyte chemotactic factor and induce interleukin-8 release but inhibit gamma interferon-inducible protein 10 production by neutrophil granulocytes. **Infect Immun**. V.70, p. 4177-84, 2002.

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.

VASILEV, N. P.; IONKOVA, I. Cytotoxic activity of extracts from *Linum* cell cultures. **Fitoterapia**. V. 76, p. 50–3, 2005.

VASILEV, N; ELFAHMI; BOS, R.; KAYSER, O.; MOMEKOV, G.; KONSTANTINOV, S.; IONKOVA, I. Production of Justicidin B, a cytotoxic aryl-naphthalene lignan from genetically transformed root cultures of *Linum leonii*. **J Nat Prod**. V.69, p. 1014–1017, 2006.

Global Health Observatory Map Gallery
<http://gamapserver.who.int/mapLibrary/app/searchResults.aspx>. Acesso em 29/05/14.
WHO, 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION – Media centre- **Leishmaniasis**- Fact sheet N° 375- February 2013 – Disponível em
<<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>> Acesso em 10/09/2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION- **Leishmaniasis: epidemiology and access to medicines**. 30 May 2012. Leishmaniasis home. Disponível em
<http://www.who.int/leishmaniasis/resources/leishmaniasis_epidemiology_access_to_medicines/en/> Acesso em 10/10/2013.

ANEXO



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

CERTIDÃO

João Pessoa, 22 de novembro de 2013.

CEUA Nº 1210/13

Ilmo(a). Prof(a) Dr(a) Márcia Rosa de Oliveira
Departamento Biologia Molecular - CCEN - UFPB

Orientando(a): Cinthia Nóbrega de Sousa Dias, (Mestrado)

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba em sua reunião ordinária de 22/11/2013 analisou e **APROVOU** a execução do projeto **AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE ANTILEISHMANIA DA LIGNANA JUSTICIDIN B ISOLADA DE Phyllanthus acuminatus E DE UMA NOVA PIRONA ISOLADA DE Hyptis macrostachys Benth.**

Com previsão de empregar **60 Camundongos SWISS Fêmeas, 60 Camundongos SWISS Machos - ANIMAIS DO BIOTÉRIO Prof. Thomas George.**

Para serem utilizados no período de **01/11/2012 a 01/07/2014**

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luis Cezar Rodrigues
Presidente da Comissão de Ética no Uso de Animal do CBiotec/UFPB

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA – CBiotec
Centro de Biotecnologia – Universidade Federal da Paraíba
<https://sites.google.com/site/ceuaacbiotec/> – ceua@cbiotec.ufpb.br