

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO**

**Valdirene Cristina Felisberto**

**Avaliação da Atividade Leishmanicida de Eusiderina A e Isatina e seus  
Derivados em *Leishmania amazonensis***

**Rio de Janeiro**

**2018**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO DE JANEIRO  
INSTITUTO DE MICROBIOLOGIA PAULO DE GÓES  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS  
(MICROBIOLOGIA)**

**Valdirene Cristina Felisberto**

**Avaliação da Atividade Leishmanicida de Eusiderina A e Isatina e seus  
Derivados em *Leishmania amazonensis***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências (Microbiologia), Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro, como parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre em Ciências (Microbiologia).

**Orientadora: Dra. Elvira Maria Saraiva**

**Co-orientador: Dr. Deivid Costa Soares**

**Rio de Janeiro**

**2018**

### CIP - Catalogação na Publicação

F313a Felisberto, Valdirene Cristina  
Avaliação da Atividade Leishmanicida de  
Eusiderina A e Isatina e seus Derivados em  
Leishmania amazonensis / Valdirene Cristina  
Felisberto. -- Rio de Janeiro, 2018.  
70 f.

Orientadora: Elvira Maria Saraiva.  
Coorientadora: Deivid Costa Soares.  
Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do  
Rio de Janeiro, Instituto de Microbiologia,  
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, 2018.

1. Atividade leishmanicida. 2. Produtos  
naturais. 3. Eusiderina A. 4. Isatina e derivados.  
5. Leishmania amazonensis. I. Saraiva, Elvira  
Maria, orient. II. Soares, Deivid Costa, coorient.  
III. Título.

Elaborado pelo Sistema de Geração Automática da UFRJ com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).



## UFRJ - Universidade Federal do Rio de Janeiro

Instituto de Microbiologia Paulo de Góes  
Coordenação de Ensino de Pós-Graduação

### ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO PROGRAMA EM CIÊNCIAS (MICROBIOLOGIA) PARA A CONCESSÃO DO GRAU DE MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (MICROBIOLOGIA)

REALIZADA EM: 04 DE SETEMBRO DE 2018

CANDIDATA: VALDIRENE CRISTINA FELISBERTO

**BANCA EXAMINADORA:** Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Angela Hampshire de Carvalho Santos Lopes  
(Presidente da Banca)  
Prof. Dr. Herbert Leonel de Matos Guedes (Membro da Banca)  
Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral (Membro da Banca)  
Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup> Juliana Echevarria Neves de Lima  
(Membro da Banca / Revisora)

**TÍTULO DA DISSERTAÇÃO: "AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DE  
EUSIDERINA A e ISALTINA E SEUS DERIVADOS EM LEISHMANIA AMAZONENSIS"**

**LOCAL:** Sala Vermelha do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da UFRJ

**HORA DE INÍCIO:** 13:00 horas

Em sessão pública, após a exposição de cerca de 60 minutos, o (a) candidato (a) foi arguido (a) oralmente pelos membros da Banca, tendo demonstrado suficiência de conhecimento e capacidade de sistematização no tema de sua Dissertação " **Avaliação da Atividade Leishmanicida de Eusiderina A e Isaltina e seus Derivados em Leishmania Amazonensis** ", sendo Aprovado (a) por unanimidade pelos membros da Banca que conferiram os seguintes graus:

Prof <sup>ª</sup> Dr <sup>ª</sup> Angela Hampshire de Carvalho S. Lopes (Presidente da Banca)	Grau...10	Conceito...A
Prof. Dr. Herbert Leonel de Matos Guedes (Membro da Banca)	Grau...10	Conceito...A
Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral (Membro da Banca)	Grau...10	Conceito...A
Prof <sup>ª</sup> Dr <sup>ª</sup> Juliana Echevarria Neves de Lima (Membro da Banca / Revisora)	Grau...10	Conceito...A
	Grau...10	Conceito...A

Na forma regulamentar, foi lavrada a presente Ata que é assinada pelos membros da Banca, e pelo (a) candidato (a).

Orientadora: *Elvira Saraiva*  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Elvira Maria Saraiva C. Bou-Habib

Rio de Janeiro, 04 de setembro de 2018.

*Angela Hampshire de C. S. Lopes*  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Angela Hampshire de C. S. Lopes.  
(Presidente da Banca)

*Herbert Leonel de Matos Guedes*  
Prof. Dr. Herbert Leonel de Matos Guedes  
(Membro da Banca)

*Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral*  
Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral  
(Membro da Banca)

*Juliana Echevarria Neves de Lima*  
Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Juliana Echevarria Neves de Lima  
(Membro da Banca / Revisora)

Coordenadora: *Agnes Marie Sá Figueiredo*  
Prof<sup>ª</sup> Agnes Marie Sá Figueiredo

Candidata: *Valdirene Cristina Felisberto*  
Valdirene Cristina Felisberto

Dedico essa dissertação à minha família,  
que sempre me apoiaram e incentivaram,  
e, à memória de minha avó Lídia.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, por me dar força, vida, saúde, bênçãos e por me guiar nesta jornada, permitindo que mais uma conquista se concretizasse em minha vida.

À meus pais, Antonio e Derci, que me ensinaram a viver a vida com dignidade, que muitas vezes renunciaram aos seus sonhos, para que pudesse realizar os meus. Obrigada pelo amor e estímulo nos momentos em que eu pensava que não ia conseguir. À minha irmã Valquíria que sempre esteve ao meu lado, me apoiando e me incentivando a conquistar meus objetivos. Ao meu esposo Nelson que nunca me impediu de crescer e pela compreensão. À minha avó Lídia, eternas saudades.

À minha orientadora Elvira Saraiva, por ter aceitado o desafio de me orientar, me dando à chance de trabalhar com *Leishmania* e produtos naturais, por ter me incluído nesse projeto, que foi fundamental para o meu crescimento. Obrigada por toda assistência e direcionamento, pelos ensinamentos e principalmente pela confiança depositada em mim.

Ao meu coorientador Deivid Costa Soares que sempre acreditou em mim e me incentivou a seguir adiante, me conduzindo a serenidade quando necessário. Obrigada pelos seus ensinamentos, incentivo, ajuda, paciência e por sempre estar por perto.

Ao melhor grupo do mundo, do laboratório de Imunobiologia das Leishmanioses como um todo. Obrigada por todos os momentos de alegria, por manterem um ambiente harmonioso e divertido, onde trabalhar se torna mais prazeroso. Ao grupo da quimioterapia pela colaboração prestada em todos os momentos, pela ajuda fundamental no desenvolvimento deste trabalho e companhia no trabalho de bancada.

À Eliete e Alice, técnicas do nosso laboratório, por contribuir com este trabalho e pela agradável convivência profissional.

Às professoras Lidilhone Hamerski e Bárbara Vasconcelos pelo isolamento e síntese de eusiderina A e isatina e seus derivados.

À Alessandra Martins pelo cultivo da cepa axênica de *Leishmania amazonensis* LV-78.

Às queridas Adriana e Ludmila, que foram fundamentais desde o início desta caminhada, obrigada por todo apoio e incentivo.

Aos membros da banca examinadora, por aceitarem o convite de avaliar este trabalho.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências(Microbiologia) pela oportunidade oferecida.

Às agências de fomento CNPq, CAPES e FAPERJ que contribuíram com apoio financeiro para a realização deste trabalho.

## RESUMO

FELISBERTO, Valdirene Cristina. Avaliação da Atividade Leishmanicida de Eusiderina A e Isatina e seus Derivados em *Leishmania amazonensis*. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências (Microbiologia)), Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

A leishmaniose é um importante problema de saúde pública que afeta milhões de pessoas em todo o mundo, e poucos avanços ocorreram em relação à sua quimioterapia. O tratamento da leishmaniose ainda depende de antimoniais pentavalentes, anfotericina B e miltefosina, que têm alta toxicidade, vários efeitos colaterais e vários casos de resistência a estes medicamentos reportados. Todos esses pontos estimulam a pesquisa de novos fármacos para o tratamento dessa patologia, e os produtos naturais constituem importante fonte de substâncias com atividade leishmanicida. Assim, neste estudo avaliamos o potencial leishmanicida de isatina e seus derivados, e da neolignana eusiderina A contra *L. amazonensis*. Em uma triagem inicial, com isatina e 16 derivados evidenciamos que os derivados ISA4, ISA5, ISA6 e ISA10 eram os mais ativos em promastigotas. Posteriormente, determinamos o IC<sub>50</sub> destes compostos mais ativos demonstrando que ISA5 e ISA10 apresentaram IC<sub>50s</sub> de 28,85 e 60,40 µM, respectivamente. A avaliação da citotoxicidade para célula hospedeira de ISA5 e ISA10 apresentou CC<sub>50s</sub> de 46,97 e 171,81 µM, respectivamente. A seguir, avaliamos se o efeito anti-promastigotas se mantinha em amastigotas tratando macrófagos infectados com ISA10 que apresentou menor toxicidade para as células hospedeiras. Nossos resultados mostraram efeito nessas formas do parasito, onde 100 µM de ISA10 reduziu 25% a infecção. A toxicidade de ISA10 para os macrófagos foi um fator limitante para a continuação desses estudos. Na tentativa de diminuir a toxicidade de ISA5, foram desenvolvidos os derivados, ISA5 cetal sem-Sub, ISA5 cetal Br e ISA5 cetal I e embora tenham reduzido a sua toxicidade para os macrófagos, a atividade anti-promastigota não foi melhorada, e seus efeitos em amastigotas não foram observados nas concentrações testadas, e este estudo foi descontinuado. O outro composto testado foi a eusiderina A, uma neolignana isolada de *Piper abutiloides*, para a qual demonstramos atividade leishmanicida concentração-dependente com IC<sub>50s</sub> de 2,3 µg/mL para promastigotas, 19 µg/mL para amastigotas axênicas e 53 µg/mL para amastigotas intracelulares. A atividade anti-*Leishmania* de eusiderina A foi independente da produção por macrófagos de espécies reativas de oxigênio, óxido nítrico, TNF-α, e atividade da arginase, apresentando baixa toxicidade para os macrófagos hospedeiros. Eusiderina A não perturbou a permeabilidade da membrana plasmática dos parasitos analisada por Sytox green nem induziu a exposição de ligantes de anexina-V. Nossos dados mostraram que eusiderina A afetou o potencial de membrana mitocondrial dos promastigotas e causou acúmulo de corpos lipídicos neutros, sugerindo que esta neolignana causa morte acidental.

Palavras-chave: Atividade leishmanicida, produtos naturais, eusiderina A, isatina e derivados, *Leishmania amazonensis*

## ABSTRACT

FELISBERTO, Valdirene Cristina. Evaluation of the Leishmanicidal Activity of Eusiderin A and Isatin and its Derivatives in *Leishmania amazonensis*. 2018. Dissertação (Mestrado em Ciências (Microbiologia)), Instituto de Microbiologia Paulo de Góes, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2018.

Leishmaniasis is a major public health problem affecting millions of people around the world, and little progress has been made in relation to its chemotherapy. Leishmaniasis treatment still depends on pentavalent antimonials, amphotericin B and miltefosine, which have high toxicity, several side effects and several resistance cases reported to these drugs. All these points stimulate the research of new drugs for the treatment of this pathology, and natural products constitute an important source of substances with leishmanicidal activity. Thus, in this study we evaluated the leishmanicidal potential of isatin and some of its derivatives, and the neolignan eusiderin A against *L. amazonensis*. In an initial screening, with isatin and 16 derivatives, we found that ISA4, ISA5, ISA6 and ISA10 derivatives were the most active in promastigotes. Subsequently, we determined the IC<sub>50</sub> of these most active compounds demonstrating that ISA5 and ISA10 presented IC<sub>50s</sub> of 28.85 and 60.40 μM, respectively. The evaluation of host cell cytotoxicity of ISA5 and ISA10 showed CC<sub>50s</sub> of 46.97 and 171.81 μM, respectively. Next, we evaluated whether the anti-promastigote effect was maintained on amastigotes by treating infected macrophages with ISA10. Our results showed effect in these parasite forms, where 100 μM ISA10 reduced the infection by 25%, however, the toxicity of ISA10 to macrophages was a limiting factor for the continuation of these studies. In an attempt to decrease the toxicity of ISA5, the derivatives, ISA5 cetal sem-Sub, ISA5 cetal-Br and ISA5 cetal-I were obtained and although their reduced toxicity to the macrophages, the anti-promastigote activity has not been improved, and its effects in amastigotes were not observed at the concentrations tested, so this study was discontinued. The other compound we tested was eusiderin A, a neolignan isolated from *Piper abutiloides*. Our results show a concentration-dependent leishmanicidal effect with IC<sub>50s</sub> of 2.3 μg/mL for promastigotes, 19 μg/mL for axenic amastigotes and 53 μg/mL for intracellular amastigotes. The anti-Leishmania activity of eusiderin A was independent of the production of reactive oxygen species, nitric oxide, TNF-α and did not affect arginase activity in these cells, moreover eusiderin A presented low toxicity to host macrophages. Eusiderin A did not disturb the plasma membrane permeability of the parasites analyzed by Sytox green nor did it induce the exposure of annexin-V ligands. Our data showed that eusiderin A affected the mitochondrial membrane potential of promastigotes and caused accumulation of neutral lipid bodies, suggesting that this neolignan causes accidental death.

Keywords: Leishmanicidal activity, natural products, eusiderin A, isatin and derivatives, *Leishmania amazonensis*

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1-</b> Ciclo biológico da <i>Leishmania spp</i> .....	4
<b>Figura 2-</b> Estrutura química da isatina.....	13
<b>Figura 3-</b> Estrutura química da isatina e seus derivados.....	15
<b>Figura 4-</b> Atividade de isatina e seus 16 derivados em <i>Leishmania amazonensis</i> .....	25
<b>Figura 5-</b> Efeito anti-promastigota de isatina e seus derivados.....	26
<b>Figura 6-</b> Citotoxicidade de isatina e seus derivados para células RAW 246-7 <i>in vitro</i> .....	27
<b>Figura 7-</b> Efeito de isatina e ISA10 na sobrevivência de amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> em macrófagos RAW 264-7 <i>in vitro</i> .....	28
<b>Figura 8-</b> Estrutura química de ISA5 e seus derivados cetais.....	29
<b>Figura 9-</b> Efeito leishmanicida de ISA5 (Cetais) <i>L. amazonensis</i> .....	29
<b>Figura 10-</b> Citotoxicidade de ISA5 (Cetais) para células RAW 246-7 <i>in vitro</i> .....	30
<b>Figura 11-</b> Efeito de ISA5 (Cetais) na sobrevivência de amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> em macrófagos RAW 264-7 <i>in vitro</i> .....	31
<b>Figura 12-</b> Estrutura química de eusiderina A.....	33
<b>Figura 13-</b> Efeito leishmanicida de eusiderina A em <i>Leishmania amazonensis</i> .....	33
<b>Figura 14-</b> Citotoxicidade de eusiderina A para macrófagos peritoneais <i>in vitro</i> .....	34
<b>Figura 15-</b> Efeito de eusiderina A em amastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> em macrófagos <i>in vitro</i> .....	34
<b>Figura 16-</b> Atividade leishmanicida para amastigotas axênicas.....	35
<b>Figura 17-</b> Ligante de Anexina V em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com eusiderina A.....	36
<b>Figura 18-</b> Avaliação da integridade da membrana de promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com eusiderina A.....	37
<b>Figura 19-</b> Avaliação potencial de membrana mitocondrial em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com eusiderina A.....	38
<b>Figura 20-</b> Análise da atividade de arginase em <i>L. amazonensis</i> na presença de eusiderina A.....	38
<b>Figura 21-</b> Acúmulo de lipídeos neutros em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados com eusiderina A.....	39
<b>Figura 22-</b> Efeito de eusiderina A na produção de óxido nítrico (NO).....	40
<b>Figura 23-</b> Produção de TNF- $\alpha$ .....	41
<b>Figura 24-</b> Efeitos da eusiderina A na produção de ROS por macrófagos peritoneais murinos.....	42
<b>Figura 25-</b> Análise da atividade da arginase em lisados de macrófagos murinos.....	43

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1-</b> Índice de seletividade para isatina e seus derivados.....	32
<b>Tabela 2-</b> Efeitos de eusiderina A no ciclo celular de <i>Leishmania amazonensis</i> .....	36

## LISTA DE ABREVIATURAS

AmB- Anfotericina B  
CC<sub>50</sub> - Concentração citotóxica para 50%  
DMSO - dimetilsulfóxido  
EA - Eusiderina A  
Frdic - Fração diclorometano  
Frhex - Fração hexânica  
FITC - Isotiocianato de fluoresceína  
IC<sub>50</sub> - Concentração inibitória para 50%  
IFN $\gamma$  - Interferon gama  
IL- Interleucina  
iNOS - Óxido Nítrico Sintase Induzida  
ISA - Isatina  
JC-1- Tetraetil Benzimidazolil Carbocianina  
LC - Leishmaniose cutânea  
LCD - Leishmaniose cutânea Difusa  
LMC - Leishmaniose mucocutânea  
LT - Leishmaniose Tegumentar  
LV - Leishmaniose Visceral  
LPS - Lipopolissacarídeo  
MILT - Miltefosina  
NK - Natural killer  
NO - Óxido Nítrico  
NOS2 - Óxido Nítrico Sintase 2  
EO - Óleo essencial do suco de açaí  
PBS - Solução Salina Fosfato  
PI - Iodeto de propídio  
PMA - 12-miristato 13-acetato  
PMS - Metossulfato de fenazina  
PS - Fosfatidilserina  
ROS - Espécies Reativas de Oxigênio  
(SbIII) - Antimoniais trivalentes  
(SbV) - Antimoniais pentavalentes  
SBF - Soro Fetal Bovino  
SDS - Dodecilsulfato de sódio  
SI - Índice de Seletividade  
Th1- Linfócito T auxiliar do tipo 1  
Th2 - Linfócito T auxiliar do tipo 2  
TGF- $\beta$  - fator de transformação e crescimento beta  
TNF- $\alpha$  - Fator de Necrose Tumoral alfa  
RPMI - Roswell Park Memorial Institute  
XTT - Sal de Tetrazólio (2,3-bis [2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazólio-5-carboxinilida)  
WHO - World Health Organization  
 $\Delta\Psi_m$  - Potencial de Membrana Mitocondrial

## SUMÁRIO

RESUMO .....	VI
ABSTRACT.....	VII
LISTA DE FIGURAS.....	VIII
LISTA DE TABELAS.....	IX
LISTA DE ABREVIATURAS.....	X
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1- Leishmanioses.....	1
1.2- Formas Clínicas.....	1
1.3- Ciclo de Vida.....	3
1.4- Resposta Imune Durante a Infecção por <i>Leishmania</i> .....	4
1.5- Tratamento.....	7
1.5.1 Antimoniais Pentavalentes.....	7
1.5.2 Anfotericina B.....	8
1.5.3 Cetoconazol.....	9
1.5.4 Pentamidina.....	9
1.5.5 Paramomicina.....	10
1.5.6 Miltefosina.....	10
1.6- Produtos Naturais com Atividade Anti- <i>Leishmania</i> .....	11
1.6.1 Isatina (1 H-indole-2,3-diona).....	12
1.6.2 <i>Piper abutiloides</i> .....	16
2. JUSTIFICATIVA.....	17
3. OBJETIVOS.....	18
3.1- Objetivo Geral .....	18
3.2- Objetivos Específicos .....	18
4. METODOLOGIA .....	19
4.1- Cultivo de parasitas.....	19
4.2- Cultura de Células Raw 264-7.....	19
4.3- Animais e obtenção de Macrófagos.....	19
4.4- Compostos.....	19
4.5- Avaliação da Atividade Anti-promastigota.....	20
4.6- Avaliação da Citotoxicidade.....	20
4.7- Avaliação da Atividade Anti-amastigota.....	20
4.8- Avaliação da Atividade Anti-amastigota Axênica.....	21
4.9- Análise do Ciclo Celular.....	21
4.10- Potencial de Membrana Mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) .....	21
4.11- Detecção de Ligantes de Receptores de Anexina V no Parasito.....	22
4.12- Atividade de Arginase.....	22
4.13- Avaliação da Integridade da Membrana de <i>Leishmania amazonensis</i> .....	22
4.14- Avaliação da Acumulação de Lipídeos em <i>Leishmania amazonensis</i> .....	23
4.15- Produção de Óxido Nítrico por Macrófagos Infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	23
4.16- Produção de TNF- $\alpha$ por Macrófagos Infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	23
4.17- Produção de ROS por Macrófagos Infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	24
4.18- Índice de Seletividade (SI).....	24
4.19- Análise Estatística.....	24
5. RESULTADOS.....	24

5.1- Isatina e seus Derivados.....	24
5.1.1 Avaliação da Atividade Anti-promastigota de Isatina e seus Derivados.....	24
5.1.2 Avaliação da Citotoxicidade de isatina e seus derivados.....	26
5.1.3 Avaliação da Atividade Anti-amastigota de Isatina e ISA10.....	27
5.1.4 Avaliação da Atividade anti-promastigota dos Cetais de ISA5.....	29
5.1.5 Avaliação da Citotoxicidade dos Cetais de ISA5.....	30
5.1.6 Avaliação da Atividade Anti-amastigota dos Cetais de ISA5.....	30
5.2- Eusiderina A.....	32
5.2.1 Avaliação da Atividade Anti-promastigota de Eusiderina A.....	33
5.2.2 Avaliação da Citotoxicidade de Eusiderina A.....	33
5.2.3 Avaliação da Atividade Anti-amastigota Intracelular de Eusiderina A.....	34
5.2.4 Avaliação da Atividade Anti-amastigota Axênica de Eusiderina A.....	35
5.2.5 Análise do Ciclo Celular.....	35
5.2.6 Detecção de Ligantes de Receptores de Anexina V em Promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> .....	36
5.2.7 Avaliação da Integridade da Membrana de <i>Leishmania amazonensis</i> .....	37
5.2.8 Avaliação do Potencial de Membrana Mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) .....	37
5.2.9 Atividade de Arginase em <i>Leishmania amazonensis</i> .....	38
5.2.10 Avaliação do Perfil Lipídico em Promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> .....	39
5.2.11 Produção de Óxido Nítrico por Macrófagos Infectados com <i>L. amazonensis</i> .....	39
5.2.12 Produção de TNF- $\alpha$ por Macrófagos Infectados com <i>Leishmania amazonensis</i> .....	40
5.2.13 Produção de ROS por Macrófagos Tratados com Eusiderina A.....	41
5.2.14 Avaliação da Atividade da Arginase em Macrófagos Tratados com Eusiderina A.....	42
6- DISCUSSÃO.....	43
7- CONCLUSÕES.....	52
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	53

## **1- INTRODUÇÃO**

### **1.1 - Leishmanioses**

As leishmanioses representam um complexo de doenças com uma importante diversidade clínica e epidemiológica. É um importante problema de saúde pública que afeta 98 países distribuídos por cinco continentes em regiões tropicais e subtropicais, com a estimativa de 0,9 a 1,7 milhão de novos casos notificados anualmente, sendo 0,7-1,3 milhão de leishmaniose cutânea e 0,2-0,4 milhão da forma visceral e cerca de 20.000 a 30.000 pessoas morrem devido a leishmaniose visceral (Alvar *et. al.*, 2012; Okwor & Uzonna, 2016; Steverding, 2017; WHO, 2018).

As leishmanioses são doenças negligenciadas que afetam, principalmente, os países pobres, em desenvolvimento e mais de 90% dos novos casos ocorrem em apenas 13 países (Afeganistão, Argélia, Bangladesh, Bolívia, Brasil, Colômbia, Etiópia, Índia, Irã, Peru, Sudão, Sudão do Sul e Síria) (Steverding, 2017). Grande parte dos casos de leishmaniose visceral ocorre no Brasil, África Oriental e no Sudeste Asiático. Entre os casos de leishmaniose cutânea, cerca de 95% ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central. Em 2015, mais de dois terços dos casos de leishmaniose cutânea ocorreram em seis países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã (República Islâmica do Irã) e República Árabe da Síria. Em relação a forma mucocutânea, quase 90% dos casos ocorreram na Bolívia, Brasil e Peru (Kumar *et. al.*, 2017; WHO, 2018).

O Brasil concentra cerca de 70% dos casos de leishmanioses na América do Sul (Barreto *et al.*, 2011), com incidência de aproximadamente 12.886 casos de leishmaniose Tegumentar (LT) e cerca de 3.336 casos de leishmaniose Visceral (LV) (WHO, 2018).

### **1.2 - Formas Clínicas**

A leishmaniose apresenta duas principais formas clínicas: visceral e tegumentar (Pintado & López-Vélez, 2001; Clem, 2010; Dias *et al.*, 2011), e dentre essas formas um amplo espectro de manifestações clínicas, que podem variar de uma úlcera cutânea de cura espontânea, destruição mucocutânea ou um grave comprometimento visceral, que pode ser letal se não for tratado adequadamente (Roberts, 2006; Kumar *et. al.*, 2017). A LV é considerada a forma mais grave, causando complicações sistêmicas e sintomas como hepatoesplenomegalia, febre irregular e prolongada, anemia e perda de peso (Roberts *et al.*, 2001; Rodrigues *et al.*, 2016; Kumar *et. al.*, 2017). A LV é caracterizada pelo tropismo dos

parasitos pelo sistema fagocítico mononuclear do baço, fígado e medula óssea (Handman, 2000), e é causada por *Leishmania donovani* e *L. infantum* no Velho Mundo e por *L. infantum* no continente americano (Roberts *et al.*, 2001).

A LT configura-se por um conjunto de enfermidades, causadas por protozoários do gênero *Leishmania* que acometem a pele e/ou mucosas. A LT compreende a forma cutânea (LC), a forma mucocutânea (LMC) e a cutânea difusa (LCD) (Murray *et al.*, 2005; Romão *et al.*, 2007; Nylén & Eidsmo, 2012). A forma cutânea é a mais comum e caracteriza-se pela presença de uma ou mais lesões cutâneas limitadas, ulcerosas de bordas elevadas com um fundo geralmente granuloso em áreas expostas ao inseto vetor, principalmente, membros inferiores (Murbach *et al.*, 2011; Von Stebut, 2015). A leishmaniose cutânea pode ser causada por *Leishmania major* e *Leishmania tropica* entre outras espécies no Velho Mundo (Nozais *et al.*, 2003) e por membros dos complexos mexicana (*L. amazonensis*, *L. mexicana*, *L. pifanoi*, *L. garnhami*, *L. venezuelensis*, *L. waltoni* entre outras espécies), braziliensis (*L. braziliensis*, *L. peruviana*) e guyanensis (*L. panamensis* e *L. shawi*) no Novo Mundo (Akhoundi *et al.*, 2017). A forma mucocutânea ocorre concomitantemente ou anos após o quadro de leishmaniose cutânea e pode progredir para intensa destruição tecidual das mucosas do nariz, boca e faringe (Murbach *et al.*, 2011; Handler *et al.*, 2015). A manifestação se dá na forma de lesões nodulares e/ou ulceradas e é causada principalmente por *L. braziliensis* (Lainson & Shaw, 1978; Kumar *et al.*, 2017) e *L. mexicana* (Barral *et al.*, 1991) no Novo Mundo. Na leishmaniose cutânea difusa ocorre uma lesão inicial com posterior disseminação para outras regiões do corpo. As lesões apresentam alta carga parasitária, na forma de nódulos não ulcerados, pápulas ou tubérculos. As principais espécies envolvidas incluem *L. mexicana* e *L. amazonensis* no Novo Mundo e *L. aethiopica* no Velho Mundo (Goto & Lauletta Lindoso, 2012).

Geralmente, a leishmaniose causada por *L. amazonensis* ocorre em toda a região amazônica e em países vizinhos, apesar de já ter sido identificada nas regiões nordeste, centro-oeste, sudeste e sul (Grisard *et al.*, 2000; Azeredo-Coutinho *et al.*, 2007). Essa espécie pode causar leishmaniose cutânea, apresentando casos que evoluem para a manifestação cutânea difusa (Silveira *et al.*, 2004), sendo também isolada de casos de leishmaniose mucocutânea (Lainson & Shaw, 1978; Lessa *et al.*, 2007) e existem relatos na literatura de visceralização causada por *L. amazonensis* (Barral *et al.*, 1991; Aleixo *et al.*, 2006; De Souza *et al.*, 2018).

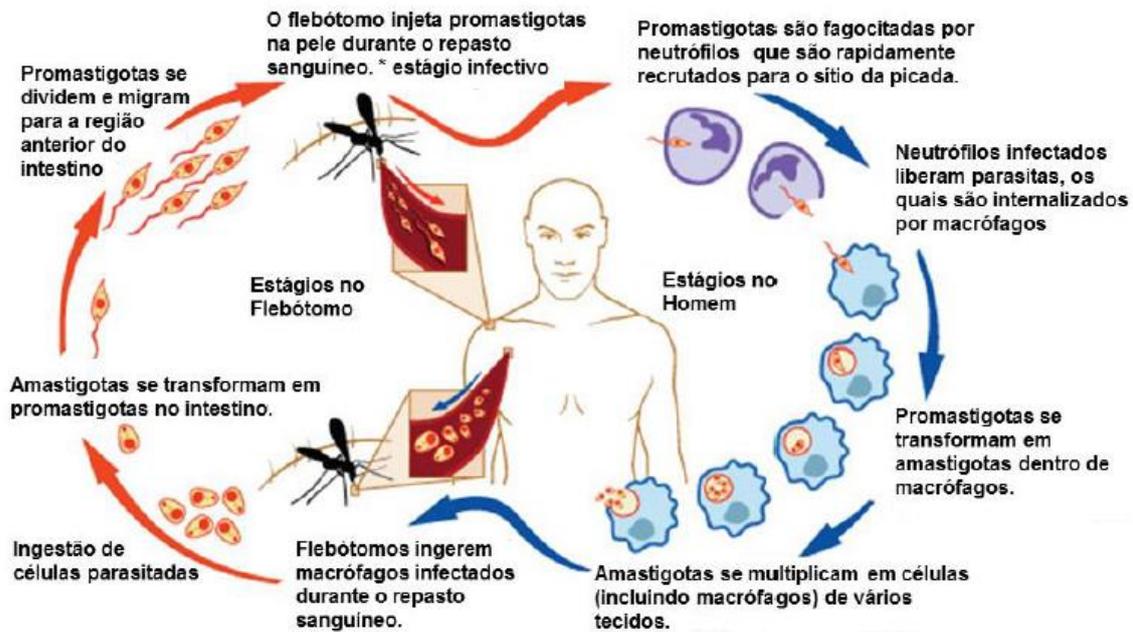
### 1.3 - Ciclo de Vida

Os parasitos pertencentes ao gênero *Leishmania* da classe Kinetoplastida, e família Trypanosomatidae são heteróxenos, necessitam de um hospedeiro invertebrado e um vertebrado para completar o seu ciclo de vida. Esses protozoários são encontrados em duas formas: uma flagelada, extracelular, presente no trato digestório do inseto-vetor, denominada promastigota e uma forma intracelular, sem flagelo livre, denominada amastigota, encontrada no interior de macrófagos do hospedeiro vertebrado (Sacks & Kamhawi, 2001; Rodríguez & Wilson, 2014; Walker *et al.*, 2014).

A transmissão dos protozoários para o hospedeiro vertebrado ocorre pela picada de fêmeas de insetos dos gêneros *Phlebotomus*, encontrados em países do Velho Mundo ou *Lutzomyia*, encontrados em países do Novo Mundo (Hashiguchi *et al.*, 2016).

O ciclo de vida (Figura 1) da *Leishmania* no inseto vetor se inicia quando formas amastigotas são ingeridas pelo flebotomíneo junto com o repasto sanguíneo em um hospedeiro infectado. As etapas seguintes ocorrem no interior da matriz peritrófica, secretada pelas células do epitélio intestinal, onde ocorre a digestão sanguínea e a transformação das formas amastigotas em promastigotas procíclicos. Após o rompimento da matriz peritrófica, através da ação das quitinases secretadas pelo parasito (Schlein *et al.*, 1992), os procíclicos se ligam às células epiteliais do intestino do inseto através da inserção de seus flagelos entre as microvilosidades, ligação esta mediada pelo lipofosfoglicano (LPG), o glicoconjugado majoritário presente na superfície dos promastigotas (revisado por Sacks & Kamhawi, 2001; Rodríguez & Wilson, 2014). A ligação dos promastigotas ao epitélio intestinal retém os parasitos durante a eliminação dos restos da digestão do sangue e é uma etapa fundamental para a colonização do inseto e posterior transmissão do parasito. Durante a infecção dos vetores, ocorre a migração dos promastigotas em direção a proboscide concomitante a sua diferenciação em promastigotas metacíclicos, em processo denominado metaciclogênese, onde os promastigotas passam de um estágio não-infectante (promastigotas procíclicos), para um estágio infectante (promastigotas metacíclicos). Promastigotas metacíclicos não se aderem às células epiteliais do intestino do flebotomo, sendo as formas inoculadas pelo vetor no momento da picada no hospedeiro vertebrado (Bates, 2007; Rodríguez & Wilson, 2014). No hospedeiro vertebrado os promastigotas metacíclicos infectam neutrófilos, primeiras células do sistema imunológico a chegarem ao local da infecção. Posteriormente, são liberados desses neutrófilos e se ligam às células do sistema fagocítico mononuclear, sendo fagocitados, e no

interior destas células se transformam em amastigotas. Nos macrófagos essas formas se encontram em um ambiente inóspito, o fagolisossoma, mas mesmo assim sobrevivem e se multiplicam lisando a célula hospedeira e infectando novas células, mantendo a infecção no hospedeiro vertebrado (Besteiro *et al.*, 2007; Walker *et al.*, 2014; Scott & Novais, 2016). Eventualmente, as formas amastigotas livres ou células infectadas podem ser ingeridas por um flebotomíneo durante o repasto sanguíneo.



**Figura 1- Ciclo biológico da *Leishmania* spp.** Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do flebotomíneo injeta promastigotas metacíclicas no local da picada. As formas promastigotas são fagocitadas por neutrófilos que são recrutados para o sítio da picada. Os neutrófilos liberam os parasitas, que são fagocitados por macrófagos teciduais. Promastigotas se transformam em amastigotas dentro de macrófagos. Amastigotas se multiplicam, lisando a célula hospedeira e infectam novas células. Amastigotas livres ou células infectadas podem ser ingeridas por um flebotomíneo durante o repasto sanguíneo. Amastigotas se transformam em promastigotas no intestino do flebotomíneo. Promastigotas se dividem e migram para a região anterior do intestino e o ciclo é reiniciado. (Adaptado de <http://www.niaid.nih.gov/topics/leishmaniasis/pages/lifecycle.aspx>).

#### 1.4 - Resposta Imune Durante a Infecção por *Leishmania*

Os aspectos clínicos e a cura das leishmanioses estão relacionados com o desenvolvimento de uma resposta imune eficaz e equilibrada pelo hospedeiro. O parasito intracelular deve ser contido, enquanto, a resposta imunológica deve ser controlada a fim de evitar maiores danos aos tecidos (Lakhal-Naouar *et al.*, 2015). Células efetoras como linfócitos T, macrófagos, células dendríticas, células natural killer e moléculas efetoras como citocinas e espécies reativas de nitrogênio e oxigênio estão envolvidos na resposta imune contra o parasito (Liese, Schleicher, Bogdan, 2008).

Na infecção por *Leishmania*, os macrófagos são ativados, tornando-se células "efetoras", que podem fagocitar e destruir o parasito. A destruição do parasito ocorre no fagolisossomo e envolve a produção de moléculas microbicidas muito importantes para a degradação de patógenos no meio intracelular como espécies reativas de oxigênio (ROS) e óxido nítrico (NO) (Khouri *et al.*, 2009; Henard *et al.*, 2014). Como células do sistema imune, uma das estratégias dos macrófagos no combate a invasores é o "burst oxidativo" induzido com a fagocitose desses organismos. Para isso, a NADPH oxidase é ativada levando à transferência de prótons para moléculas de oxigênio, formando diversas moléculas altamente reativas, como superóxidos, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, que são tóxicas para o patógeno (Henard *et al.*, 2014). Essas moléculas são cruciais para controlar a carga parasitária durante o curso da leishmaniose visceral e cutânea (Henard *et al.*, 2014). Sendo assim, o desencadeamento de uma resposta bem orquestrada relacionada à produção de radicais (ROS, O<sub>2</sub><sup>-</sup>, OH<sup>-</sup>, NO) pelo processo de "burst oxidativo", auxiliará no combate do parasito e na defesa do organismo (Van Assche *et al.*, 2011) e esse pode ser um dos caminhos para o desenvolvimento de novos medicamentos contra diferentes espécies de *Leishmania*.

Os macrófagos podem eliminar ou promover o crescimento dos amastigotas intracelulares, em função do equilíbrio de duas enzimas induzíveis, a óxido nítrico sintase 2 (NOS2) e arginase, que utilizam um substrato comum, a L-arginina, e são competitivamente reguladas pelas citocinas Th1 e Th2 (Modolell *et al.*, 1995). Os macrófagos podem ser ativados por diferentes sinais, os quais são cruciais para eliminação ou sobrevivência do parasito. Essa ativação pode ser dividida em via clássica e via alternativa. O destino do parasito intracelular depende do tipo de sinal que os macrófagos recebem: a via clássica é mediada por produtos das células Th1 e NK (natural killer), em particular o IFN- $\gamma$ , os quais estimulam os macrófagos a produzir NOS2, uma enzima que catalisa a transformação de L-arginina em óxido nítrico (NO), que é tóxico para o parasito (Wei *et al.*, 1995; Liu & Uzonna, 2012). Por outro lado, a ativação alternativa é induzida pelas citocinas de perfil Th2, tais como IL-4 e IL-13, que leva a expressão de arginase, que hidrolisa a L-arginina em uréia e ornitina, sendo esta última a principal fonte intracelular para a biossíntese de poliaminas e que favorece a sobrevivência do parasito nos macrófagos. Essa competição pode definir o destino da infecção por *Leishmania* (Loke *et al.*, 2002; Liu & Uzonna, 2012; Acuña, *et al.*, 2017).

Está bem estabelecido para o modelo murino de infecção por *L. major*, que camundongos BALB/c, são suscetíveis ao parasito devido a uma resposta,

predominantemente Th2, que é caracterizada, principalmente, pelo aumento da produção de interleucina-4 (IL-4), IL-10 e fator de transformação e crescimento- $\beta$  (TGF- $\beta$ ), bem como a diminuição da produção de IL-12, interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ). Camundongos resistentes, como C57BL/6 e C3H/HeJ, apresentam cura espontânea por desenvolver uma resposta, predominantemente do tipo Th1. Os macrófagos ativados pela ação do IFN- $\gamma$  são cruciais para a resolução da lesão (Sacks & Anderson, 2004; Gupta *et al.*, 2013). Nesses animais, a produção de IL-12 estimula a produção de IFN- $\gamma$  que, subsequentemente, ativa os macrófagos induzindo a produção de óxido nítrico (NO), um dos principais fatores de destruição do parasito. No modelo de susceptibilidade, a alta produção de IL-4 e IL-10 inibem a produção de NO pelos macrófagos, favorecendo o estabelecimento da infecção (Norsworthy *et al.*, 2004; Scott & Novais, 2016). A importância de citocinas do tipo Th2 para o estabelecimento da infecção é confirmada pela capacidade de cura da lesão observada em camundongos BALB/c deficientes de IL-4 e IL-10 ou tratados com anti-IL-10 ou anti-IL-4 (Sacks & Anderson, 2004).

A infecção por *L. amazonensis* não apresenta essa dicotomia Th1/Th2 na resposta de camundongos como observado para *L. major* (Tripathi, Singh, & Naik, 2007; Mendes Wanderley *et al.*, 2012). A maioria das linhagens de camundongos é susceptível à infecção por *L. amazonensis*, sendo a linhagem BALB/c muito susceptível, enquanto C3H, C57BL/6, DBA e CBA são consideradas menos susceptíveis, pois apresentam desenvolvimento de lesão mais lento (Ji, Sun & Soong, 2003; Pereira & Alves, 2008). Durante o curso da infecção, células T CD4<sup>+</sup> são capazes de produzir diferentes tipos de citocinas tanto Th2 quanto Th1, como por exemplo, IL-4 e IFN- $\gamma$ , respectivamente (Ji *et al.*, 2002) que caracterizam uma resposta celular não polarizada (Norsworthy *et al.*, 2004; Mendes Wanderley *et al.*, 2012). A deleção do gene IL-4 ou IL-10 bem como o tratamento de camundongos infectados com IFN $\gamma$  ou IL-12 causam efeitos mínimos sobre o desenvolvimento da lesão e da carga parasitária (Barral-Netto *et al.*, 1996; Jones, Buxbaum, Scott, 2000; Jones *et al.*, 2002; Mendes Wanderley *et al.*, 2012). Estudos sugerem que para o modelo de infecção por *L. amazonensis* o estabelecimento da infecção parece não ser exclusivamente devido à produção de citocinas de padrão Th2, mas sim por falha no desenvolvimento de uma resposta Th1 (Afonso & Scott, 1993; Jones, Buxbaum, Scott, 2000).

Há evidências de que *L. amazonensis* tem uma capacidade particular de interferir em vários mecanismos imunológicos necessários para a produção de uma resposta efetiva. A

elevada produção de IL-10 e baixa produção de IFN- $\gamma$  durante o processo de infecção por *L. amazonensis* culminará com a inibição da enzima iNOS e diminuição da produção de ROS fundamentais no processo de morte das formas amastigotas, fazendo com que o parasito seja capaz de se desenvolver no hospedeiro (Mukbel *et al.*, 2007; Van Assche *et al.*, 2011).

## **1.5 - Tratamento**

O tratamento das leishmanioses é realizado com alguns fármacos disponíveis no mercado, sendo os medicamentos de primeira escolha os antimoniais pentavalentes que são utilizados desde a década de 1950 (Ponte-Sucre *et al.*, 2017) e em caso de falha utiliza-se anfotericina B e suas formulações lipídicas, pentamidina, paromomicina, cetoconazol e a miltefosina como medicamentos de segunda escolha (Ouellette *et al.*, 2004; Croft, Seifert, Yardley, 2006; Andrews *et al.*, 2014). No entanto, com exceção da miltefosina e do cetoconazol, todos precisam ser administrados por via parenteral, o que exige a colaboração do paciente. Esses medicamentos apresentam alto custo, longa duração de tratamento, são tóxicos e apresentam efeitos adversos como calafrios, febre, tromboflebite, miocardite, nefrotoxicidade podendo levar ao óbito (Croft, Seifert, Yardley, 2006; Andrews *et al.*, 2014; Ghorbani & Farhoudi, 2017).

### **1.5.1 - Antimoniais Pentavalentes**

Os antimoniais foram utilizados inicialmente na sua forma trivalente (SbIII), mas foram sendo substituídos pelos antimoniais pentavalentes (SbV) que mostraram-se eficazes contra a leishmaniose visceral, além de serem menos tóxicos (Ouellette *et al.*, 2004). O mecanismo de ação destes fármacos não é muito claro. Sabe-se que a forma pentavalente é inativa contra a forma promastigota de *Leishmania* spp. Entretanto, os íons do parasito e da superfície da célula hospedeira promovem a redução à forma trivalente, que é mais ativa e tóxica dentro dos macrófagos, atuando assim nas formas amastigotas do parasito (Lindoso *et al.*, 2012; Mohapatra, 2014).

Desde a década de 1950, os compostos de antimônio pentavalente como Pentostam® (estibogluconato de sódio, Wellcome Foundation, UK) e Glucantime® (meglumina antimoniató, Rhône Polenc, França), foram propostos como medicamentos de primeira linha para o tratamento da leishmaniose na dose de 20-28 mg/kg/dia por 28-30 dias, por via intramuscular ou intravenosa (Jain & Jain, 2013; Mohapatra, 2014), sendo indicados para o

tratamento de todos os tipos de manifestações clínicas da leishmaniose. Esses medicamentos apresentam uma série de problemas, são tóxicos para os rins, fígado e pâncreas, apresentam efeitos adversos, tais como náuseas, anorexia, tonturas, artralgia, mialgia, febre, além de alto custo (Fernandez *et al.*, 2014; Lindoso *et al.*, 2012). Além disso, há o aumento no número de resistência parasitária, particularmente na Índia, onde é reportado 65% de taxa de falha terapêutica (Jain & Jain, 2013).

Quando há restrições ou falha no tratamento com esses fármacos, outros medicamentos chamados de fármacos de segunda escolha devem ser usados. Os fármacos alternativos para antimônio pentavalente incluem anfotericina B e suas formulações lipídicas, pentamidina, paromomicina, cetoconazol e miltefosina (Prajapati *et al.*, 2011; Wiwanitkit, 2012, Vakil, Fujinamin & Shah, 2015).

### **1.5.2 - Anfotericina B**

Anfotericina B (AmB) é um antibiótico com atividade antifúngica, isolado da bactéria filamentosa *Streptomyces nodusus*, que pode ser usado por via parenteral para o tratamento da leishmaniose, pois é efetivo em diferentes espécies de *Leishmania* (Vakil, Fujinamin & Shah, 2015). A AmB interage com o ergosterol da membrana dos parasitos, causando aumento na permeabilidade e morte (Mohapatra, 2014; Chávez-Fumagalli *et al.*, 2015). A dose recomendada é de 1mg/kg/dia por 15-20 dias, diariamente ou em dias alternados, por via intravenosa (Sundar *et al.*, 2007; Andrews *et al.*, 2014; Rajasekaran & Chen, 2015; Chávez-Fumagalli *et al.*, 2015). Contudo, o uso clínico de AmB tem sido limitado devido a sua alta toxicidade, podendo causar nefrotoxicidade, alterações cardíacas, hemólise e dano hepático, além de náusea e febre (Chávez-Fumagalli *et al.*, 2015; Vakil, Fujinamin & Shah, 2015).

Com o objetivo de reduzir os efeitos colaterais e a toxicidade da anfotericina B e melhorar a sua farmacocinética e biodisponibilidade, foram desenvolvidas formulações lipídicas deste medicamento, como, AmBisome®, uma formulação lipossomal; Amphocil®, uma dispersão coloidal e Abelcet®, um complexo lipídico (Andrews *et al.*, 2014; Chávez-Fumagalli *et al.*, 2015).

Um estudo realizado na Bolívia com *L. braziliensis* provou que a anfotericina B lipossomal foi mais eficiente (taxa de cura de 85 %), mais bem tolerada e mais custo-efetiva que os antimoniais. Outro estudo realizado no Brasil com *L. braziliensis* mostrou uma taxa de cura de 81%, com baixos efeitos colaterais (Monge-Maillo & López-vélez, 2013; Sundar &

Chakravarty, 2015). Anfotericina B lipossomal é usada na dose de 2,5-5,0 mg/kg/dia e sua formulação reduz o tempo total de tratamento para metade do tempo quando comparada com a forma não lipossomal (McGwire & Satoskar, 2014).

Essas formulações apresentam menor toxicidade ao indivíduo, quando comparado à anfotericina B não lipossomal, entretanto, possuem um custo elevado (Andrews *et al.*, 2014; Chávez-Fumagalli *et al.*, 2015).

### **1.5.3 - Cetoconazol**

O cetoconazol é um azol originalmente utilizado contra infecções fúngicas, que têm mostrado cura em infecções causadas por *L. mexicana*, sendo utilizado na concentração de 600 mg diariamente, via oral por 28-30 dias (McGwire & Satoskar, 2014; Sundar & Chakravarty, 2015). Estudos mostraram que o tratamento com doses diárias de 600 mg de cetoconazol via oral por 28 dias obteve taxa de resposta entre 76 e 90% em infecções causadas por *L. panamensis*, *L. mexicana*, mas não para *L. braziliensis* (Monge-Maillo & López-Vélez, 2013; Handler *et al.*, 2015). O mecanismo de ação do cetoconazol está relacionado com a inibição da síntese de esterol, impedindo a formação da membrana celular, além de outras funções metabólicas que acarretam na morte do parasito (Sundar & Chakravarty, 2015). Pacientes em tratamento prolongado com compostos azóis requerem testes sanguíneos de rotina para avaliar anormalidades da função hepática (McGwire & Satoskar, 2014).

### **1.5.4 - Pentamidina**

A pentamidina (isetionato de pentamidina) foi utilizada no início da década de 1980 para o tratamento da LV refratária na Índia; no entanto, seu uso foi abandonado para a LV devido à sua grave toxicidade e eficácia decrescente (Sundar & Chakravarty, 2015). Esse medicamento tem sido utilizado para o tratamento da LC na América do Sul causada por *L. guyanensis* e *L. panamensis* (McGwire & Satoskar, 2014). Os mecanismos antimicrobianos precisos da pentamidina são desconhecidos, mas o medicamento interfere com a síntese de DNA de *Leishmania* e afeta a membrana mitocondrial, levando à morte do parasito (Lindoso *et al.*, 2012). A dosagem para LC é de três doses de 4 mg/kg/dia ou em dias alternados sendo administradas por via intravenosa ou intramuscular (WHO, 2018). Embora a pentamidina possa ser administrada para todas as formas de leishmaniose, apresenta baixa eficácia, é

altamente tóxica e desencadeia efeitos adversos importantes, como diabetes mellitus, hipoglicemia grave, hipotensão, miocardite e toxicidade renal (Lindoso *et al.*, 2012; Singh, Kumar & Singh, 2012; Vakil, Fujinamin & Shah, 2015).

#### **1.5.5 - Paromomicina**

A paromomicina é um antibiótico de largo espectro extraído da bactéria *Streptomyces rimosus* var. e foi introduzido pela primeira vez como fármaco anti-*Leishmania* na forma de sulfato de paromomicina em 2002 (Lindoso *et al.*, 2012; Wiwanitkit, 2012; Mohapatra, 2014). O medicamento afeta a síntese de proteínas e interfere no potencial de membrana mitocondrial (Lindoso *et al.*, 2012; Mohapatra, 2014; Rajasekaran & Chen, 2015). A paromomicina é um medicamento alternativo para o tratamento da leishmaniose, sendo administrado por via intramuscular na dose de 15 mg/kg por 21 dias, para tratamento de LV. No entanto, pode causar reações adversas graves, incluindo nefrotoxicidade e hepatotoxicidade (Jain & Jain, 2013). Para o tratamento de LC é preconizado a administração por via tópica (pomada) em uma formulação de 15% de paromomicina e 12% de cloreto de metilbenzetônio por 20 dias (WHO, 2018). Existem vários ensaios clínicos em andamento para conhecer os resultados de eficácia desse medicamento por diferentes vias. Há a possibilidade de resistência com a monoterapia de paromomicina e para combater este problema, novas formulações, como a paromomicina carregada em a microesfera de albumina e com lipossoma, estão sendo estudadas (Mohapatra, 2014).

#### **1.5.6 - Miltefosina**

Um avanço significativo na terapia da leishmaniose foi a introdução da miltefosina que, originalmente foi desenvolvida para o tratamento do câncer de mama (Croft & Coombs, 2003), e passou a ser utilizada na Índia a partir de março de 2002 para o tratamento da leishmaniose. Após um ensaio de Fase III em que a dose de 50 - 100 mg/dia por 28 dias resultou em uma taxa de cura de longo prazo de 94% e um estudo de Fase IV, no qual apresentou uma taxa de cura de 95%, a miltefosina passou a ser usada no tratamento da leishmaniose (Sundar *et al.*, 2002; Bhattacharya *et al.*; 2007).

Esse medicamento foi escolhido para o programa de tratamento da leishmaniose na Índia, Nepal e Bangladesh por sua facilidade de uso e aplicabilidade no programa de controle, e tem sido usado na última década em 14 países para o tratamento de LV e LC. No entanto,

após uma década de uso desse medicamento na Índia, a taxa de reincidência dobrou e sua eficácia parece ter diminuído. Seu mecanismo de ação em *Leishmania* não é bem compreendido, embora se pense que ela desequilibra o metabolismo lipídico, que envolve fosfolipídios e esteróis, causando a morte do parasito (Sundar *et al.*, 2012; Mohapatra, 2014; Vakil, Fujinamin & Shah, 2015). Alguns estudos têm demonstrado que a miltefosina induz morte celular por apoptose, provocando diversas alterações no parasito (Paris *et al.*, 2004).

A dose recomendada para miltefosina é de 100 mg/dia, durante 28 dias (Jain & Jain, 2013). Contudo, leves efeitos adversos gastrointestinais, tais como diarreia, náuseas e vômitos foram observados, e seu uso é limitado para mulheres em idade fértil, uma vez que o efeito colateral mais grave deste medicamento é a indução de teratogênese (Pandey *et al.*, 2009; Dorlo *et al.*, 2012; Lindoso *et al.*, 2012).

Além de todos os problemas apontados anteriormente, o surgimento de cepas resistentes aos medicamentos vem aumentando rapidamente em todo o mundo, por isso existe uma necessidade urgente do desenvolvimento de novos fármacos e/ou terapias contra a leishmaniose (Sánchez-Cañete *et al.*, 2009; Andrews *et al.*, 2014; Ferreira *et al.*, 2017).

## **1.6 – Produtos Naturais com Atividade Anti-*Leishmania***

Produtos naturais são utilizados há séculos para o tratamento de diversas doenças, entre elas as infecções parasitárias, mas só recentemente os pesquisadores começaram a analisar criteriosamente as propriedades farmacológicas observadas em produtos naturais utilizados na medicina popular (Iwu *et al.*, 1994; Anthony *et al.*, 2005; Rocha *et al.*, 2005; Sen & Chatterjee, 2011). Os produtos naturais utilizados na medicina popular contra as leishmanioses, geralmente, são administrados de forma oral para casos de leishmaniose visceral e como preparações tópicas para leishmaniose cutânea. A avaliação científica desses produtos naturais é importante para obtenção de compostos para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento das leishmanioses, uma vez que a ausência de vacina e de medicamentos mais eficientes e de baixo custo influencia cada vez mais as pesquisas (Rocha *et al.*, 2005; Anthony *et al.*, 2005; Sen & Chatterjee, 2011). Entretanto, dentre as mais de 200.000 espécies de plantas da flora mundial, menos de 10% estão sendo estudadas para determinar cientificamente os efeitos obtidos na medicina popular, embora quase 25% dos compostos ativos de medicamentos prescritos nos Estados Unidos e Inglaterra tenham sido

isolados de produtos naturais e um número significativo de substâncias sintéticas é obtido de precursores naturais (Rates, 2001; Anthony *et al.*, 2005; Kunle *et al.*, 2012).

Diferentes estudos demonstraram que os produtos naturais são uma fonte promissora para a busca de novos medicamentos para o tratamento de doenças tropicais negligenciadas, como a leishmaniose. A atividade leishmanicida já foi relatada para diversos gêneros de diferentes famílias, como Apocynaceae (*Peschiera*) (Delorenzi *et al.*, 2001), Crassulaceae (*Kalanchoe*) (Muzitano *et al.*, 2006), Asteraceae (*Baccharis*) (Tempone *et al.*, 2008), Solanaceae (*Physalis*) (Guimarães *et al.*, 2009), Euphorbiaceae (*Croton*) (Lima *et al.*, 2015), Verbenaceae (*Lippia*) (Funari *et al.*, 2016), Sapindaceae (*Serjania*) (Passos *et al.*, 2017), Annonaceae (*Guatteria latifolia*) (Ferreira *et al.*, 2017) entre várias outras (Oliveira *et al.*, 2016).

Fitoconstituintes isolados de plantas têm apresentado uma potente atividade leishmanicida, dentre eles podemos incluir os compostos fenólicos, lignanas, neolignanas, chalconas, flavonóides, isoflavonóides, saponinas, quinonas, alcalóides, taninos, terpenóides, iridóides e terpenos (Sen & Chatterjee, 2011; Tiuman *et al.*, 2011), que vem sendo estudados para a identificação de novos medicamentos e/ou para modificações semi-sintéticas a fim de melhorar a atividade terapêutica e diminuir os efeitos tóxicos do composto (Wright & Phillipson, 1990).

Os exemplos citados acima indicam a importância da utilização de produtos naturais para o desenvolvimento de fármacos para o tratamento das leishmanioses que sejam mais eficientes, menos tóxicos para o hospedeiro e de menor custo.

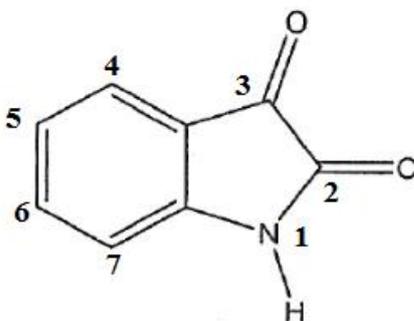
### **1.6.1 – Isatina (1 H-indole-2,3-diona)**

É uma molécula pequena, versátil e apresenta atividades anticonvulsivantes e ansiogênicas (Pakravan *et al.*, 2013). A isatina está presente em plantas do gênero *Isatis*, *Couroupita guianensis*, *Calanthe discolor* e também como um constituinte da secreção da glândula parótida de sapos do gênero *Bufo* (Da Silva, Garden & Pinto, 2001; Vine, *et al.*, 2009). O composto tem uma estrutura de anel de indol, comum a várias substâncias. Os derivados de indol possuem propriedades biológicas, incluindo anti-inflamatória, analgésica, antioxidante, antimalárico e leishmanicida (Pakravan *et al.*, 2013; Delorenzi *et al.*, 2001 e 2002).

A isatina (Figura 2) é considerada um substrato sintético muito versátil, ou seja, é um

composto cuja estrutura molecular pode ser facilmente modificada, originando diversos compostos derivados da mesma, compostos estes, heterocíclicos, tais como indóis e quinolonas, que também podem ser utilizados como matéria-prima para a síntese de diversos fármacos (Da Silva, Garden & Pinto, 2001; Chaudhary *et al.*, 2013). Diversos efeitos fisiológicos da isatina e seus derivados têm sido descritos, como anticonvulsivantes (Sareen *et al.*, 1962; Pandeya *et al.*, 2005), anti-inflamatórios (Fernandes *et al.*, 2014), antituberculose (Raj *et al.*, 2014), antimicrobianos (Raj *et al.*, 2003) e antimalárico (Nisha, *et al.*, 2014). Esse amplo espectro de atividades biológicas têm sido facilitado pela versatilidade sintética da isatina, que permitiu a geração de um grande número de derivados estruturalmente diversos, incluindo análogos com substituição do anel aril e/ou derivação do nitrogênio da isatina e dos carbonos C2 e C3 (Vine *et al.*, 2009).

Os derivados halogenados da isatina possuem na sua estrutura um ou mais átomos de halogênio (Cl, F, Br, I) e são considerados moléculas bioativas muito promissoras, utilizadas frequentemente na síntese de substâncias químicas com vista ao desenvolvimento de novos compostos de interesse farmacêutico (Naumov & Anastsova, 2001; Vine *et al.*, 2007; Jarrahpour *et al.*, 2007; Vine *et al.*, 2009). A relação estabelecida entre a estrutura da molécula e a sua atividade determina que as moléculas substituídas nas posições C5, C6 e C7, com um ou mais átomos de halogênio, apresentam melhores resultados em comparação com a isatina. No entanto, quando o átomo se encontra na posição C5, a molécula apresenta melhores resultados relativamente à atividade fármaco-terapêutica, há um aumento acentuado nas potencialidades contra várias bactérias, fungos e vírus (Karali *et al.*, 2007; Vine *et al.*, 2009).



**Figura 2- Estrutura química da isatina.** Estrutura química da isatina sinalizando as posições no anel (1 ao 7). Adaptado de Matheus *et al.*, 2007.

Os derivados da isatina que possuem flúor na sua estrutura apresentaram atividade antibacteriana e antifúngica (Prakash & Raja, 2013). O derivado com átomo de flúor na

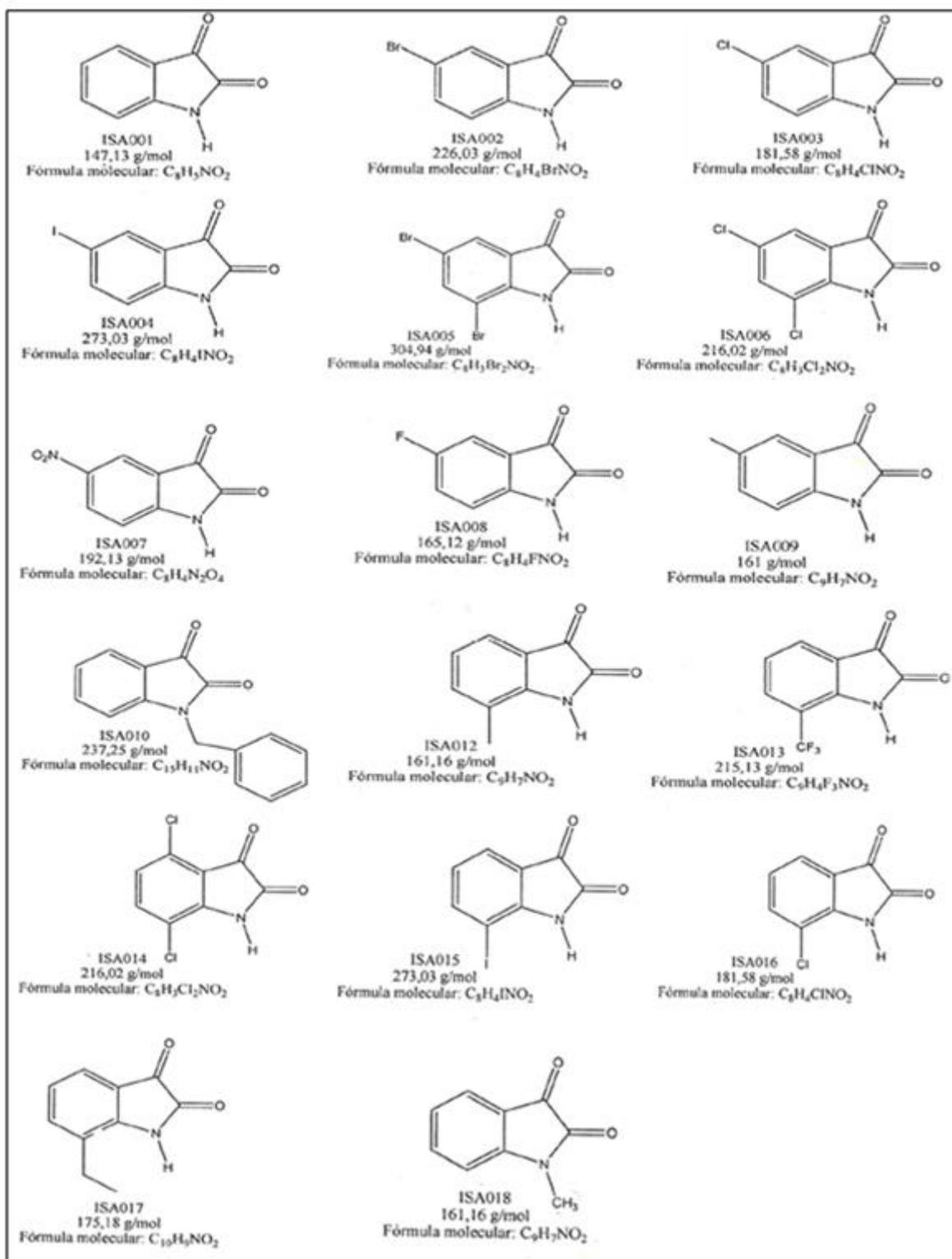
posição C5 foi utilizado na síntese de uma série de compostos, alguns dos quais apresentaram atividade contra tuberculose, verificada através da inibição completa do *Mycobacterium tuberculosis* (Aboul-Fadl & Bin-Jubair, 2010). Os derivados com os átomos de bromo e de cloro apresentaram atividade antifúngica e antibacteriana (Pandeya *et al.*, 1999; Sriram *et al.*, 2005), e são também relevantes devido às suas propriedades citotóxicas e antineoplásicas (Vine *et al.*, 2007; Sabet, *et al.*, 2010), como é o caso dos derivados com bromo nas posições C5, C6 e C7, alguns dos quais com mais de um átomo de halogéneo no anel benzeno, aspecto que parece influenciar positivamente a atividade anticancerígena da molécula (Vine *et al.*, 2009).

Modificação estrutural a partir de moléculas isoladas de plantas também tem sido utilizada para avaliar a atividade anti-*Leishmania*. Araújo e colaboradores (1999) realizaram modificações estruturais na molécula de curcumina, de *Curcuma longa*, e o composto com maior atividade contra promastigotas de *L. amazonensis* foi o derivado metilcurcumina, que também reduziu o tamanho da lesão *in vivo* em 65,5%.

Na busca por novos compostos ativos contra *Leishmania*, Khan e colaboradores (2017), sintetizaram uma série de derivados bis(indol)-piridínicos, dos quais os compostos (7 e 8) apresentaram boa inibição nos testes para *L. donovani*, em relação ao controle positivo estibogluconato de sódio.

Já foi descrito pelo nosso grupo que substâncias derivadas do indol como coronaridina e 18 methoxi-coronaridina, apresentam atividade anti-*Leishmania*. A coronaridina é capaz de inibir a sobrevivência e o crescimento dos amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, e este efeito ocorre com mudanças ultraestruturais na mitocôndria do parasito (Delorenzi *et al.*, 2001). A 18 methoxi-coronaridina (18-MCOR), obtida através de modificação da estrutura química do composto, possibilitou que este análogo sintético melhorasse seu efeito anti-amastigota de *L. amazonensis* com redução na toxicidade observada com coronaridina para as células hospedeiras (Delorenzi *et al.*, 2002).

O papel de isatina e seus derivados na infecção por *Leishmania* tem sido pouco explorado (Pervez *et al.*, 2014), e as propriedades antimicrobianas, como atividade anti-*Mycobacterium tuberculosis* (Raj *et al.*, 2014) e anti-*Plasmodium* (Nisha, *et al.*, 2014) demonstrado por isatina e seus derivados nos estimulou a investigá-los em relação ao seu potencial leishmanicida, assim, avaliamos o potencial leishmanicida de isatina e seus derivados mostrados na Figura 3.



**Figura 3- Estrutura química da isatina e seus derivados.** Estrutura química da isatina e seus 16 derivados (ISA2, ISA3, ISA4, ISA5, ISA6, ISA7, ISA8, ISA9, ISA10, ISA12, ISA13, ISA14, ISA15, ISA16, ISA17 e ISA18) com seus respectivos pesos e fórmulas moleculares. Imagens cedidas por Silva, 2013.

### 1.6.2 – *Piper abutiloides*

A família Piperaceae reúne um conjunto de plantas com atividade antimicrobiana, como efeito leishmanicida, anti-*Trypanosoma* e anti-*Plasmodium* (Ferreira *et al.*, 2011; Bernuci *et al.*, 2016; Varela *et al.*, 2016; Araújo-Vilges *et al.*, 2017). Várias substâncias ativas têm sido isoladas de espécies da família Piperaceae, podendo ser destacadas as amidas, os alcalóides, as lignanas, as neolignanas, os terpenos, os esteróides, as chalconas e os flavonóides (Parmar *et al.*, 1997; Santos *et al.*, 2001). O gênero *Piper*, é o maior gênero da família Piperaceae, apresentando distribuição pantropical (Jaramillo & Manos, 2001). Várias classes de metabólitos foram isoladas de espécies de *Piper* como cromenos (Lago *et al.*, 2004), amidas (Dyer & Palmer, 2004), alcalóides (Ee *et al.*, 2009), lignanas (Parmar *et al.*, 1997; Martins *et al.*, 2003), neolignanas (Parmar *et al.*, 1997) dentre outros (Kato & Furlan, 2007).

A espécie *Piper abutiloides*, é uma planta nativa do Brasil, proveniente da mata atlântica fluminense e que apresenta atividade antifúngica e analgésica (Costa *et al.*, 1989; Johann *et al.*, 2009; Johann *et al.*, 2010).

Em estudos desenvolvidos anteriormente, muitos compostos derivados de espécies do gênero *Piper* demonstraram atividade anti-parasitária (Flores *et al.*, 2009). O extrato de *Piper betle* e *Piper chaba* foram ativos contra promastigotas de *L. donovani* (Misra *et al.*, 2009; Naz *et al.*, 2012). *Piper ovatum* e *Piper hispidum* mostraram atividade contra *L. amazonensis*, enquanto, extratos e frações de *Piper ovatum* foram ativos contra promastigotas e amastigotas, *Piper hispidum* foi efetivo apenas contra amastigotas (Ruiz *et al.*, 2011).

Nakamura e colaboradores (2006) pesquisaram a atividade biológica do extrato e de várias frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* Yunck sobre promastigotas de *L. amazonensis*, demonstrando que tanto o extrato quanto as frações apresentaram atividade anti-promastigota.

Nosso grupo evidenciou que a piperina, o principal alcalóide isolado de *Piper nigrum*, e seu análogo fenilamida são ativos contra promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* (Ferreira *et al.*, 2011). Os dois compostos induziram alterações mitocondriais com perda do potencial de membrana mitocondrial. O ciclo celular de promastigotas também foi afetado com um aumento nas células da fase G1 e uma diminuição nas células da fase S, após tratamento com piperina e fenilamida. A análise lipídica de promastigotas mostrou que a

piperina reduziu os teores de triglicerídeos, diacilglicerol e monoacilglicerol, enquanto a fenilamida reduzia apenas os níveis de diacilglicerol (Ferreira *et al.*, 2011).

Embora haja vários relatos de substâncias com atividade leishmanicida provenientes do gênero *Piper* a atividade anti-*Leishmania* do extrato, frações e substâncias isoladas de *Piper abutiloides* ainda não foi caracterizada. O potencial leishmanicida demonstrado pelo gênero *Piper* nos estimulou a estudar em um ensaio bioguiado sua atividade leishmanicida, pois se acredita que *Piper abutiloides* tem potencial para combater o parasito, pelo seu grau de parentesco com as espécies acima.

Neste estudo avaliamos o potencial leishmanicida de eusiderina A uma neolignana que foi isolada pela primeira vez por Hobbs e King em 1960 e que apresenta atividade antifúngica (Syamsurizal & Afrida, 2012; Syamsurizal & Afrida, 2014; Muhaimin *et al.*, 2017).

Neolignanas são metabólitos secundários encontrados em vários grupos de angiospermas. Vários efeitos biológicos e farmacológicos foram relatados para esta classe de metabólitos secundários, incluindo antioxidantes (Lee *et al.*, 2004), antitumoral (Kang *et al.*, 2012), antimicrobiano (Leon-Diaz *et al.*, 2010), tripanocida (Cabral *et al.*, 2010, Pelizzaro-Rocha *et al.*, 2011), anti-*Leishmania* (Aveniente *et al.*, 2007, Vendrametto *et al.*, 2010) e antimalárico (Zhang *et al.*, 2001) entre outros.

A atividade anti-*Leishmania* de neolignanas foi descrita por vários grupos de pesquisa. Barata e colaboradores (2000) mostraram que a neolignana surinamensina, isolada de *Virola surinamensis* apresenta atividade anti-*L. donovani*. A neolignana eupomatenoide-5, obtida a partir de folhas de *Piper regnellii* var. *pallescens* demonstrou atividade contra *L. amazonensis* (Vendrametto *et al.*, 2010). Nérís e colaboradores (2013) demonstraram que a licarina A é ativa contra promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. major*. De Castro e colaboradores (2017) evidenciaram a atividade anti-*Leishmania* da neolignana 2,3-dihydrobenzofurano para promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*.

Com os estudos citados acima, pode-se concluir que neolignanas possuem características de possíveis fontes de moléculas e protótipos para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos contra as leishmanioses.

## **2- JUSTIFICATIVA**

As leishmanioses são doenças endêmicas em várias partes do mundo, mas poucos avanços foram feitos em relação à quimioterapia, como a introdução de novos regimes de

tratamento ou a reformulação de substâncias antigas, tais como anfotericina B lipossomal. Exceto pela miltefosina, originalmente desenvolvida para o tratamento do câncer mamário, nenhum novo medicamento foi introduzido para o tratamento da leishmaniose desde a introdução dos antimoniais há mais de 80 anos.

A gravidade desta doença, a ausência de um tratamento eficaz, alto custo e o surgimento de cepas resistentes aos fármacos utilizados, tornam urgente a pesquisa de novas alternativas para a terapia das leishmanioses. A descoberta de novos fármacos, sintéticos ou naturais, que possam ser eficientes, inclusive contra as cepas resistentes aos medicamentos disponíveis, com efeitos adversos reduzidos ou ausentes, passíveis de serem utilizados, é de extrema importância.

Desta forma, o estudo dos produtos naturais aqui propostos poderá fornecer novas substâncias efetivas, cuja utilização de forma isolada ou em associação com fármacos já utilizados no tratamento das leishmanioses poderá diminuir os efeitos adversos e aumentar sua eficácia.

### **3- OBJETIVOS**

**3.1- Objetivo Geral:** Avaliar o potencial de eusiderina A isolada de *Piper abutiloides* e de isatina e seus derivados para o desenvolvimento de novas substâncias leishmanicidas.

#### **3.2- Objetivos Específicos:**

- Avaliar o efeito de eusiderina A e de isatina e seus derivados sobre o crescimento de promastigotas de *Leishmania amazonensis*;
- Verificar a citotoxicidade de eusiderina A e de isatina e seus derivados para células hospedeiras;
- Caracterizar a atividade anti-amastigota intracelular de eusiderina A e de isatina e seus derivados;
- Avaliar a atividade anti-amastigota axênica de eusiderina A;
- Avaliar o papel imunomodulatório das substâncias ativas contra amastigotas intracelulares avaliando a produção de óxido nítrico, espécies reativas de oxigênio, citocinas e atividade de arginase;

- Estudar o possível mecanismo das substâncias com maior atividade analisando o ciclo celular, a produção de arginase, o potencial mitocondrial, os receptores de anexina V, a permeabilidade da membrana e o acúmulo de lipídeos no parasito.

## **4- METODOLOGIA**

### **4.1 Cultivo do Parasito**

As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (WHOM/BR/75/Josefa) foram cultivadas a 26°C em meio de Schneider (Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF- Cultilab) e 40 µg/mL de gentamicina (Schering-Plough, Rio de Janeiro, RJ, Brasil).

### **4.2 Cultura de Células RAW 264-7**

Macrófagos murinos da linhagem RAW 264-7 foram cultivados a 35°C com 5% de CO<sub>2</sub> em meio RPMI-1640 (Sigma), acrescido de 5% de SFB e 1x da solução de 100 unidades de penicilina e 0,1mg/mL de estreptomicina(estoque=100x) (Sigma). Para os repiques e os experimentos, as células foram removidas por raspagem utilizando *cell scrapers* e mantidas a 4°C até o uso.

### **4.3 Animais e Obtenção de Macrófagos**

Camundongos BALB/c (fêmeas/4 a 6 semanas) foram inoculados com 3% de tioglicolato no peritônio e após 3 dias os macrófagos foram obtidos por lavagem peritoneal com 10 mL de meio RPMI-1640 a 4°C. Os protocolos envolvendo animais possuem licença da comissão de ética no uso de animais do Centro de Ciências da Saúde da UFRJ (Permissão CEUA: 2018, Protocolo: 128-15; CONCEA: 01200.001568 / 2013-87).

### **4.4 Compostos**

Isatina e seus derivados foram sintetizados pela Dra. Bárbara Vasconcellos da Silva do Instituto de Química – UFRJ e eusiderina A provenientes da folha de *Piper abutiliodes* foi isolada e fornecida pela Dra. Lidilhone Hamerski do Núcleo de Pesquisa de Produtos Naturais – UFRJ. Todos os compostos utilizados neste trabalho tiveram como veículo dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma).

#### **4.5 Avaliação da Atividade Anti-promastigota**

Formas promastigotas de *L. amazonensis* ( $5 \times 10^6$  parasitos/mL) foram cultivadas na presença ou não de isatina e seus derivados, eusiderina A ou de DMSO (veículo) em meio Schneider suplementado com 10% de SFB. As células foram incubadas por 48 h a 26°C e sua viabilidade foi determinada por adição de 0,5 mg/mL de XTT (2,3-bis [2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-2H-tetrazólio-5-carboxinilida, Sigma) e 20 mM metossulfato de fenazina (PMS, Sigma). Após 3 h de incubação, o produto da reação foi lido a 450 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como a percentagem de células viáveis em comparação com o controle não tratado.

#### **4.6 Avaliação da Citotoxicidade**

Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c ( $5 \times 10^5$  células/mL) e de linhagem RAW 264-7 ( $2 \times 10^5$  células/mL) cultivados em placas de 96 poços, foram utilizados para avaliar a citotoxicidade de eusiderina A e isatina e seus derivados. Os macrófagos foram tratados com diferentes concentrações dos compostos e DMSO e incubados por 48 h a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, a viabilidade celular foi determinada por adição de 50 µl de uma solução de 0,5 mg/mL XTT e 20 mM de PMS. Após 3 h de incubação a 37°C o produto da reação foi lido a 450 nm. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados expressos como a percentagem de células viáveis em comparação com o controle não tratado.

#### **4.7 Avaliação da Atividade Anti-amastigota**

Macrófagos peritoneais ( $5 \times 10^5$  células/mL) e de linhagem RAW 264-7 ( $2 \times 10^5$  células/mL) aderidos em placas de 24 poços foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* (fase estacionária) em uma proporção parasito:macrófago de 10:1 e incubados por 24 h a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS para remover os parasitos livres e RPMI + 10% SFB foi adicionado, e as células incubadas com diferentes concentrações de eusiderina A e isatina e seus derivados por 24 h a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. Após esse tempo, as culturas foram incubadas com 0,01% de dodecilsulfato de sódio (SDS) durante 5 min e, posteriormente, 800 µL de meio Schneider suplementado com 10% de SFB foi acrescentado às culturas. Após 48 h a 26°C, a carga intracelular relativa de amastigotas viáveis foi mensurada indiretamente através do número de promastigotas

provenientes da transformação dos amastigotas, usando Alamar Blue (Invitrogen), de acordo com as instruções do fabricante. Após 4 h de incubação, a fluorescência foi lida a 540/610 nm de excitação/emissão em fluorímetro SpectraMax Paradigm (Molecular Devices).

#### **4.8 Avaliação da Atividade Anti-amastigota Axênica**

Formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis* (RAT/BA/74/LV78) ( $1 \times 10^7$  parasitos/mL), cultivadas em meio Grace's (Sigma) contendo 10% de SFB foram incubadas na presença ou não de diferentes concentrações de eusiderina A e DMSO (veículo) por 48 h a 32°C com 5% de CO<sub>2</sub>. O crescimento dos parasitos foi avaliado pelo método Alamar Blue conforme descrito acima. Os experimentos foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como a porcentagem de células viáveis em comparação com o controle não tratado.

#### **4.9 Análise do Ciclo Celular**

Promastigotas ( $5 \times 10^6$  parasitos/mL) foram incubados em meio Schneider suplementado com 10% de SFB na presença ou ausência de 10 µg/mL de eusiderina A e 30 µM de miltefosina por 48 h a 26°C. Os parasitos foram então lavados com PBS, fixados (30% PBS/70% metanol (Vetec)) por 1 h a 4°C e, posteriormente, incubados em uma solução de PBS contendo 10 µg/mL de RNase (Sigma) e 10 µg/mL de iodeto de propídio (PI-Sigma) 37°C por 45 min. Para cada amostra 10.000 eventos foram coletados em FACScalibur (Becton & Dickson) e analisados com o software Cellquest.

#### **4.10 Potencial de Membrana Mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )**

Promastigotas ( $5 \times 10^6$  parasitos/mL) foram incubados em meio Schneider suplementado com 10% de SFB na presença ou ausência de 10 µg/mL de eusiderina A e 30 µM de miltefosina durante 48 h. As células foram então centrifugadas, lavadas e ressuspendidas em PBS. Em seguida, o número de parasitos foi ajustado ( $5 \times 10^6$  parasitos/mL), e incubados com uma solução de JC-1 (10 µg/mL, Sigma) por 20 min a 37°C. O  $\Delta\Psi_m$  foi medido por fluorometria em placas opacas de 96 poços usando excitação/emissão de 490/530 nm (monômeros JC-1) e excitação/emissão de 525/590 nm (J-agregados).

#### **4.11 Detecção de Ligantes de Receptores de Anexina V no Parasito**

A marcação dupla para anexina V-isotiocianato de fluoresceína (Annexin V-FITC) e Iodeto de propídio (PI) foi realizada utilizando o kit de detecção de apoptose Annexin-V (Molecular Probes). Promastigotas foram tratados ou não com 10 µg/mL de eusiderina A e 30 µM de miltefosina durante 48 horas. Posteriormente, as células foram lavadas duas vezes em tampão de anexina V gelado e centrifugadas a 2740 g durante 10 min. Os parasitos ressuspensos em 480 µL de tampão de anexina foram marcados com 20 µL de anexina V-FITC e incubados por 15 min no escuro a 37°C. A intensidade da marcação anexina V-FITC foi avaliada em 10.000 eventos coletados em FACScalibur (Becton e Dickson). Em seguida 0,4 µg/ml de PI foi adicionada a estes mesmos parasitos e nova leitura realizada. Os resultados foram analisados usando o software CellQuest.

#### **4.12 Atividade de Arginase**

Promastigotas ( $5 \times 10^6$  parasitos/mL) foram incubados em meio Schneider suplementado com 10% de SFB na presença ou ausência de 10 µg/mL de eusiderina A durante 48 h. Macrófagos peritoneais ( $5 \times 10^5$  células/mL) aderidos infectados ou não como descrito anteriormente, tratados ou não com 26 µg/mL de eusiderina A, estimulados ou não com IL-4 (40 ng/mL) e mantidas em RPMI + 10% SFB a 37°C com 5% CO<sub>2</sub> por 48 h. Posteriormente, os parasitos ou os macrófagos foram lisados com 100 µl de Triton X-100 a 0,1% durante 30 min, seguido pela adição de 100 µl de um tampão contendo 25 mM de Tris-HCl (pH 7,5) (PlusOne) e 10 mM de MnSO<sub>4</sub> (Sigma). A enzima foi então ativada por aquecimento por 10 min a 56°C, e a hidrólise da arginina foi realizada incubando o lisado ativado com 100 µl de L-arginina 0,1M (pH 9,7) (Sigma) a 37°C durante 15 min. A reação foi interrompida com 800 µl de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>-H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>-H<sub>2</sub>O (1: 3: 7 v/v/v (Vetec)) e a uréia foi determinada a 540 nm após adição de 25 µL de α-isonitrosopropiofenona (Sigma) 9% (dissolvida em etanol a 100%) e aquecida a 95°C durante 30 min. A curva padrão foi determinada utilizando a uréia (Sigma).

#### **4.13 Avaliação da Integridade da Membrana de *Leishmania amazonensis***

Promastigotas ( $5 \times 10^6$  parasitos/mL) foram incubados em meio Schneider suplementado com 10% de SFB na presença ou ausência de 10 µg/mL de eusiderina A por 48

horas a 26°C. Após, as células foram incubadas com 0,5 µM de Sytox green (Life Technologies) durante 20 min a 37°C e a fluorescência medida usando excitação/emissão de 485/538 nm. Controle positivo foi obtido pela adição de Triton X-100 (Fluka) a 0,05%.

#### **4.14 Avaliação da Acumulação de Lipídeos em *Leishmania amazonensis***

Promastigotas ( $5 \times 10^6$  parasitos/mL) foram incubados em meio Schneider suplementado com 10% de SFB na presença ou ausência de 10 µg/mL de eusiderina A por 48 h a 26°C. Posteriormente, as células foram centrifugadas, lavadas e ressuspendidas em PBS. O número de parasitos foi ajustado ( $5 \times 10^6$  parasitos/mL), e incubados com 10 µg/ml de Nile red (Invitrogen) durante 20 min a 37°C. A marcação com Nile red foi medida por fluorometria em placas opacas de 96 poços usando excitação/emissão de 490/528 nm.

#### **4.15 Produção de Óxido Nítrico por Macrófagos Infectados com *L. amazonensis***

Macrófagos peritoneais murinos ( $5 \times 10^5$  células/mL) aderidos foram infectados ou não com promastigotas de *L. amazonensis* (fase estacionária) em uma proporção parasito:macrófago de 10:1 e incubados por 24 h a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS para remover os parasitos livres, e em seguida, ativadas ou não com LPS (200 ng/mL), tratadas ou não com 26 µg/mL de eusiderina A e mantidas em RPMI + 10% SFB por 48 h. A produção de óxido nítrico foi avaliada através do método de Griess (Sigma) (1% sulfanilamida e 0,1% *N*-(1-naphthyl)-ethylenediamina dihydrochloreto/2,5% H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>), onde o nitrito presente na amostra reage em meio ácido com uma amina aromática (sulfanilamida), produzindo um sal diazônico. Este reagirá com a *N*-(1-naphthyl)-ethylenediamina dihydrochloreto formando um complexo de coloração rósea (Green *et al.*, 1990; Soares *et al.*, 2007). A reação foi lida a 540 nm e a concentração de nitrito foi determinada utilizando NaNO<sub>2</sub> como padrão.

#### **4.16 Produção de TNF-α por Macrófagos Infectados com *L. amazonensis***

Macrófagos peritoneais murinos ( $5 \times 10^5$  células/mL) infectados ou não foram incubados por 48 h a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>, e ativados ou não com LPS (200 ng/mL), e tratados ou não com 26 µg/mL de eusiderina A como descrito acima. A produção de TNF-α foi avaliada por ELISA específico de acordo com as instruções do fabricante (Ebioscience, CA, US), em ensaios realizados em triplicata.

#### **4.17 Produção de ROS por Macrófagos Infectados com *L. amazonensis***

Macrófagos peritoneais murinos ( $5 \times 10^5$  células/mL) infectados como descrito anteriormente foram incubados por 2h a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. Posteriormente, as células foram lavadas com PBS para remover os parasitos livres, e adicionado RPMI sem MOPS (Lac-Biotecnologia). As células foram tratadas ou não com 26 µg/mL de eusiderina A e/ou 200 ng/mL de 12-miristato 13-acetato (PMA; Sigma), e incubadas com 50 µM da sonda Dihydrorhodamine 123 (DHR 123; Life Technologies) durante 30 min a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. A produção de ROS foi mensurada através da intensidade de fluorescência, medida em 500/526 nm de excitação/emissão em fluorímetro (SpectarMax Paradigm, Molecular Devices).

#### **4.18 Índice de Seletividade (SI)**

O (SI) foi calculado dividindo-se o valor do CC<sub>50</sub> obtido em macrófagos pelo valor do IC<sub>50</sub> em promastigotas ou amastigotas de *L. amazonensis* (Tiuman *et al.*, 2005; Passos *et al.*; 2015).

#### **4.19 Análise Estatística**

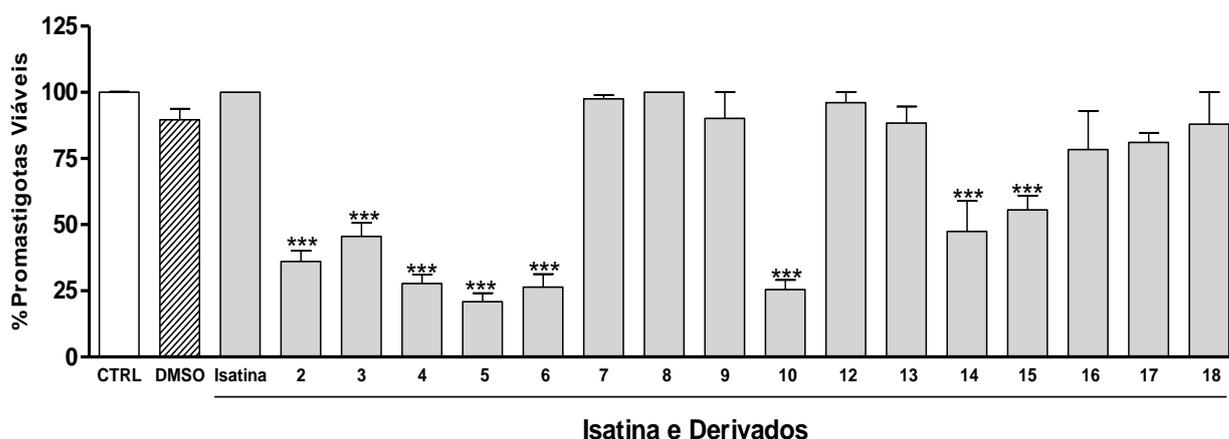
Os dados foram analisados pelo *teste t* de Student para comparação de dois grupos ou análise de variância (*one-way* ANOVA) e pós-teste de Tukey, para mais de dois grupos. As análises foram feitas utilizando o software GraphPad Prism 5.0. O valor de *P* foi considerado significativo quando menor ou igual a 0,05.

### **5. RESULTADOS**

#### **5.1 Isatina e seus Derivados**

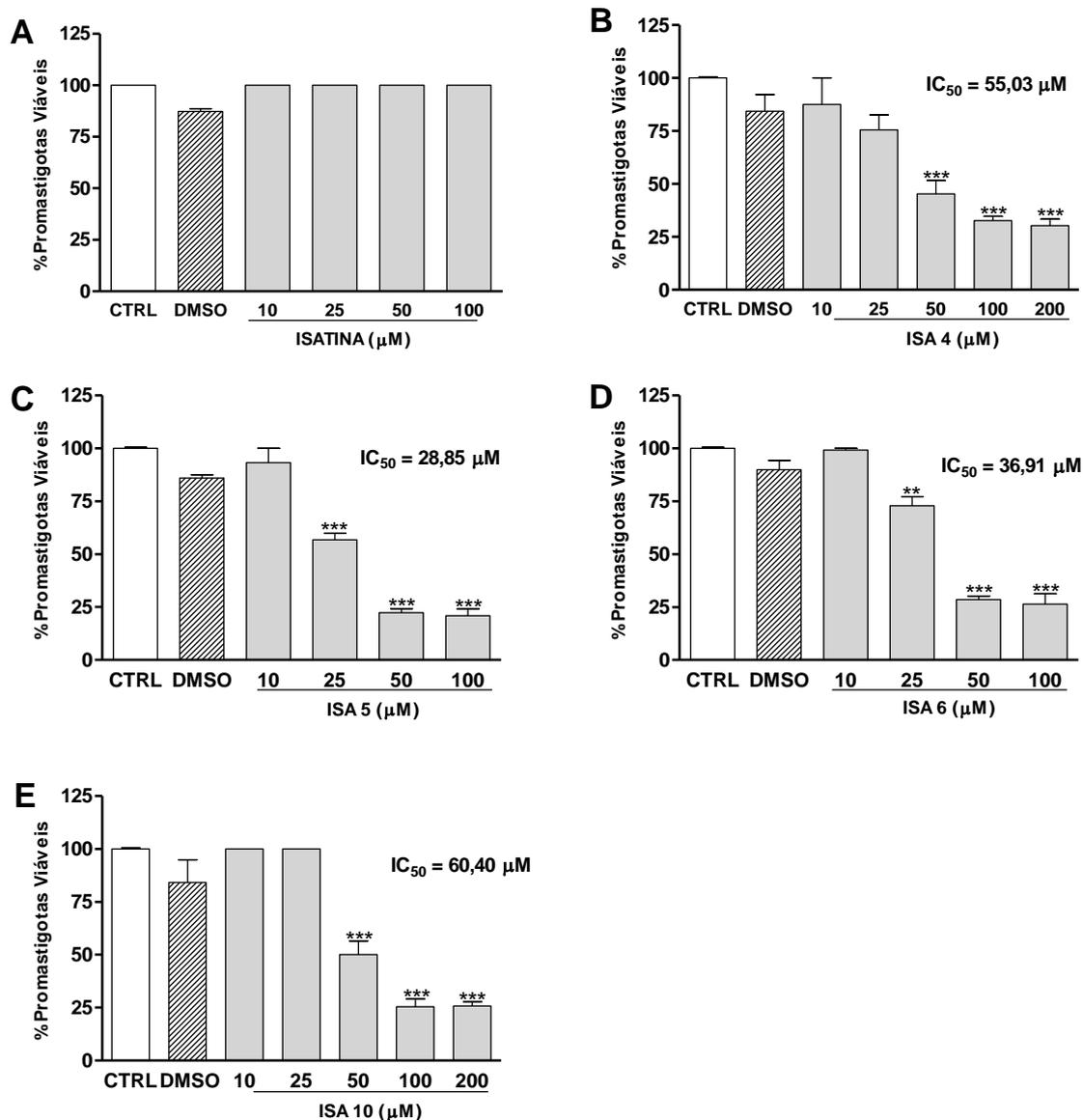
##### **5.1.1 Avaliação da Atividade Anti-promastigota de Isatina e seus Derivados**

Primeiramente, nós realizamos uma triagem com a isatina e seus 16 derivados na concentração de 100 µM. A triagem inicial demonstrou que isatina não apresentou atividade contra promastigotas de *L. amazonensis* e que os derivados ISA2, ISA3, ISA4, ISA5, ISA6, ISA10, ISA14 e ISA15 foram ativos, sendo os derivados mais ativos ISA4, ISA5, ISA6 e ISA10, que apresentaram 72%, 79%, 73% e 74% de inibição, respectivamente (Figura 4).



**Figura 4- Atividade de isatina e seus 16 derivados em *Leishmania amazonensis*.** Promastigotas foram tratadas com isatina e seus derivados na concentração de 100  $\mu\text{M}$  durante 48 horas a 26°C. DMSO (0,6%) foi utilizado como controle do veículo. A viabilidade dos parasitos foi testada utilizando o método de XTT conforme descrito na metodologia. Os resultados são mostrados como média + erro padrão da média (SEM) de três experimentos independentes. \*\*\* $P < 0,0001$  em relação ao controle não tratado.

Após a triagem inicial as formas promastigotas foram tratadas com diferentes concentrações de isatina e seus derivados mais ativos. Nossos resultados demonstraram que isatina não apresentou atividade contra as formas promastigotas em nenhuma das concentrações testadas e que ISA4, ISA5, ISA6 e ISA10 apresentaram atividade concentração-dependente com  $\text{IC}_{50}$  de 55,03; 28,85; 36,91 e 60,40  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Figura 5).

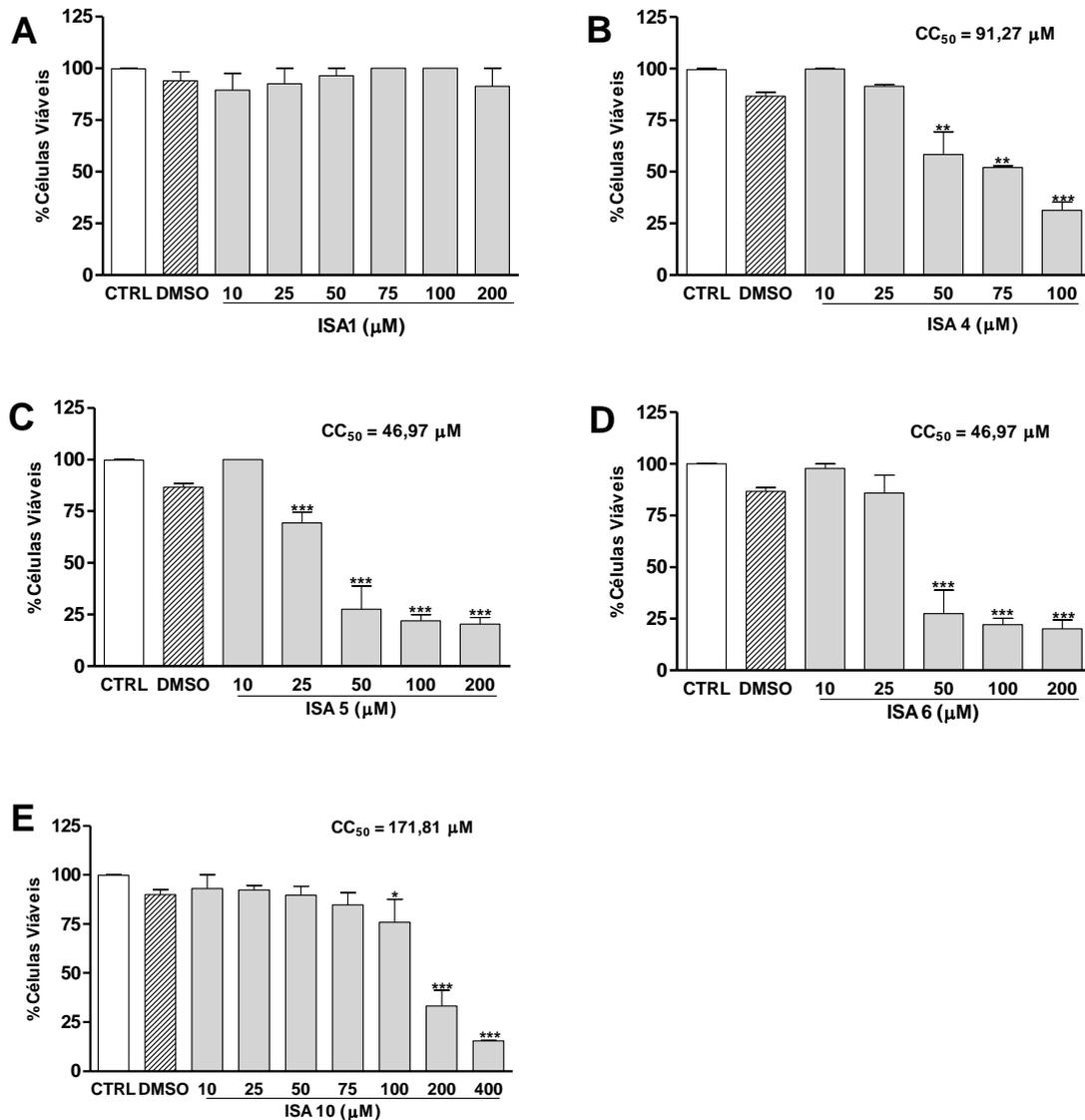


**Figura 5- Efeito anti-promastigota de isatina e seus derivados.** Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* foram tratadas com (A) isatina, (B) ISA4, (C) ISA5, (D) ISA6 e (E) ISA10 nas concentrações indicadas durante 48 horas a 26°C. DMSO (0,6%) foi utilizado como controle do veículo. A viabilidade dos parasitos foi testada utilizando o método de XTT conforme descrito na metodologia. Os resultados são mostrados como média + SEM de três experimentos independentes. \*\* $P < 0,01$  \*\*\* $P < 0,0001$  em relação ao controle não tratado.

### 5.1.2 Avaliação da Citotoxicidade de Isatina e seus Derivados

Para verificar a citotoxicidade de isatina e seus derivados, avaliamos a atividade das desidrogenases mitocondriais dos macrófagos da linhagem RAW 264-7, utilizando o método do XTT. Os derivados ISA4, ISA5, ISA6, ISA10 apresentaram  $CC_{50}$  de 91,27; 46,97; 46,97 e 171,81 μM, respectivamente (Figura 6).

Nossos resultados demonstraram que aproximadamente 100% das células permanecem viáveis após o tratamento com isatina e ISA10 até a concentração de 200 e 75  $\mu\text{M}$ , respectivamente, quando comparadas ao controle não tratado, sugerindo que isatina e ISA10 não alteraram a viabilidade dos macrófagos até essas concentrações (Figura 6A-E).

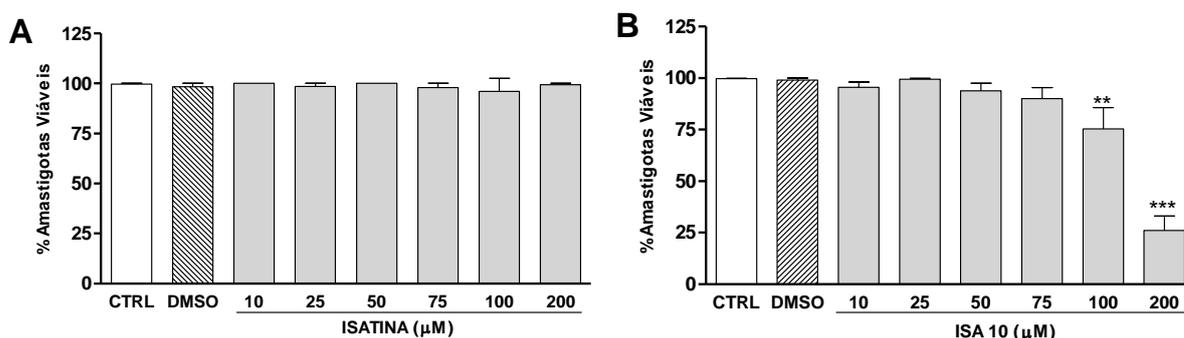


**Figura 6- Citotoxicidade de isatina (ISA1) e seus derivados para células RAW 246-7 *in vitro*.** As células foram tratadas com (A) ISA1, (B) ISA4, (C) ISA5, (D) ISA6 e (E) ISA10 nas concentrações indicadas por 48 horas a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. A viabilidade dos parasitos foi testada utilizando o método do XTT conforme descrito na metodologia. DMSO (0,6%) foi utilizado como controle do veículo. Os resultados são mostrados como média + SEM de três experimentos independentes. \*\* $P < 0,01$  \*\*\* $P < 0,0001$  em relação ao controle não tratado.

### 5.1.3 Avaliação da Atividade Anti-amastigota de Isatina e ISA10

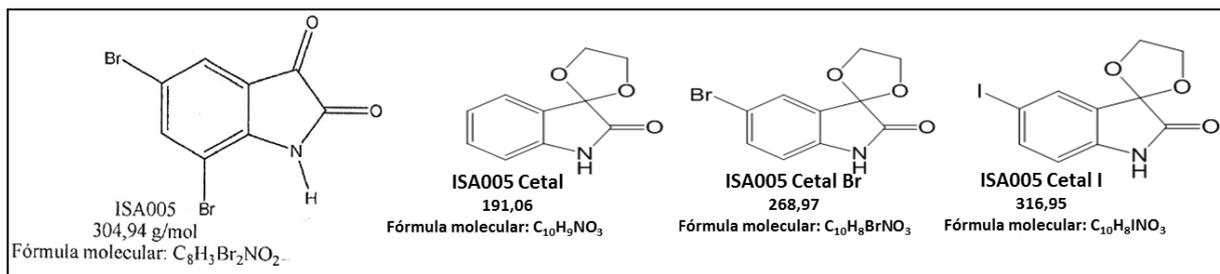
Tendo em vista, que os derivados ISA4, ISA5, ISA6 apresentaram toxicidade para os macrófagos a partir da concentração de 50  $\mu\text{M}$  e que isatina e ISA10 apresentaram menor

toxicidade para os macrófagos, nós as selecionamos para avaliação contra as formas amastigotas intracelulares. A sobrevivência de formas amastigotas foi avaliada em macrófagos de linhagem RAW 264-7 infectados *in vitro*. Nossos resultados demonstraram que isatina (Figura 7A) não apresentou atividade contra as formas amastigotas de *L. amazonensis* até a concentração de 200  $\mu\text{M}$  e que ISA10 (Figura 7B) foi ativa a partir da concentração de 200  $\mu\text{M}$  com inibições de 24,6% e de 74% nas concentrações de 100  $\mu\text{M}$  e 200  $\mu\text{M}$ , respectivamente.



**Figura 7- Efeito de isatina e ISA10 na sobrevivência de amastigotas de *Leishmania amazonensis* em macrófagos RAW 264-7 *in vitro*.** Macrófagos de linhagem RAW 264-7 foram infectados com promastigotas por 24 horas e, posteriormente, foram tratados com isatina (A) ou ISA10 (B) nas concentrações indicadas ou 0,6% de DMSO (controle veículo) durante 24 horas a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. A viabilidade dos parasitos foi testada com Alamar blue conforme descrito na metodologia. Os resultados são mostrados como média+SEM de três experimentos independentes. \*\* $P < 0,01$  \*\*\* $P < 0,0001$  em relação ao controle.

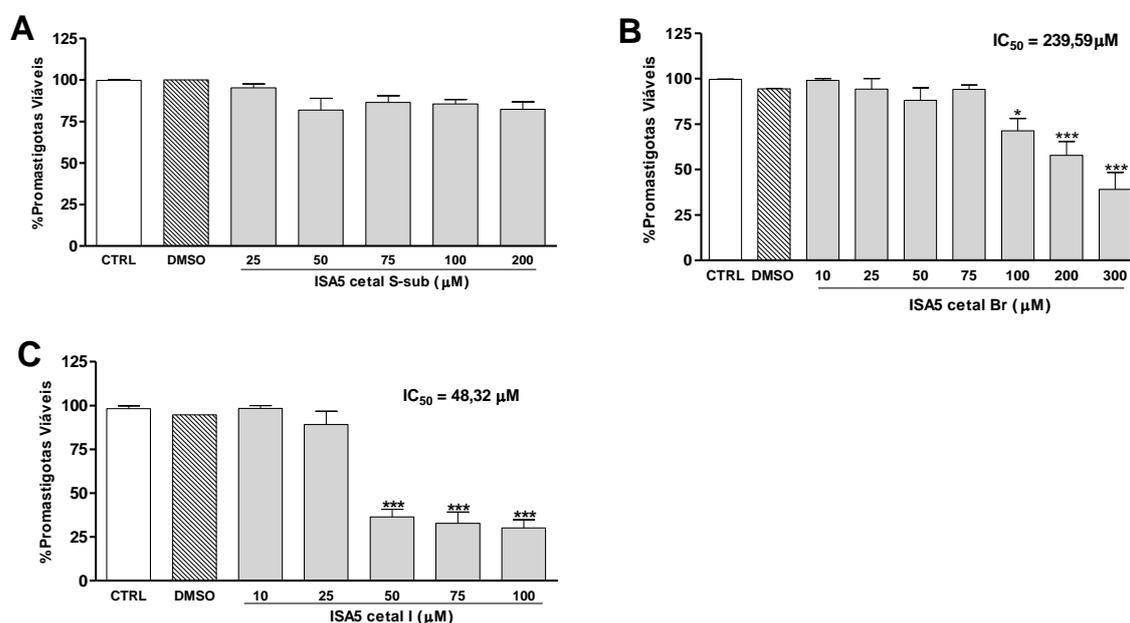
ISA5 apresentou IC<sub>50</sub> de 28,85  $\mu\text{M}$  para promastigotas, o melhor entre os derivados testados, mas sua citotoxicidade foi alta para os macrófagos RAW 264-7. Na tentativa de diminuir essa toxicidade e melhorar sua atividade, foram realizadas alterações na estrutura química de ISA5, dando origem aos derivados ISA5 cetal sem-substituição (ISA5 cetal sem-Sub), ISA5 cetal Bromo (ISA5 cetal Br) e ISA5 cetal Iodo (ISA5 cetal I), cujas estruturas estão mostradas na Figura 8. Nosso próximo passo foi avaliar a atividade anti-promastigota, anti-amastigota e citotoxicidade desses derivados.



**Figura 8 - Estrutura química de ISA5 e seus derivados cetais.** Estrutura química de ISA5 e seus derivados (ISA5 cetal sem-substituição, ISA5 cetal Bromo e ISA5 cetal Iodo com seus respectivos pesos e fórmulas moleculares. Imagens cedidas por Silva, 2013.

#### 5.1.4 Avaliação da Atividade anti-promastigota dos Cetais de ISA5

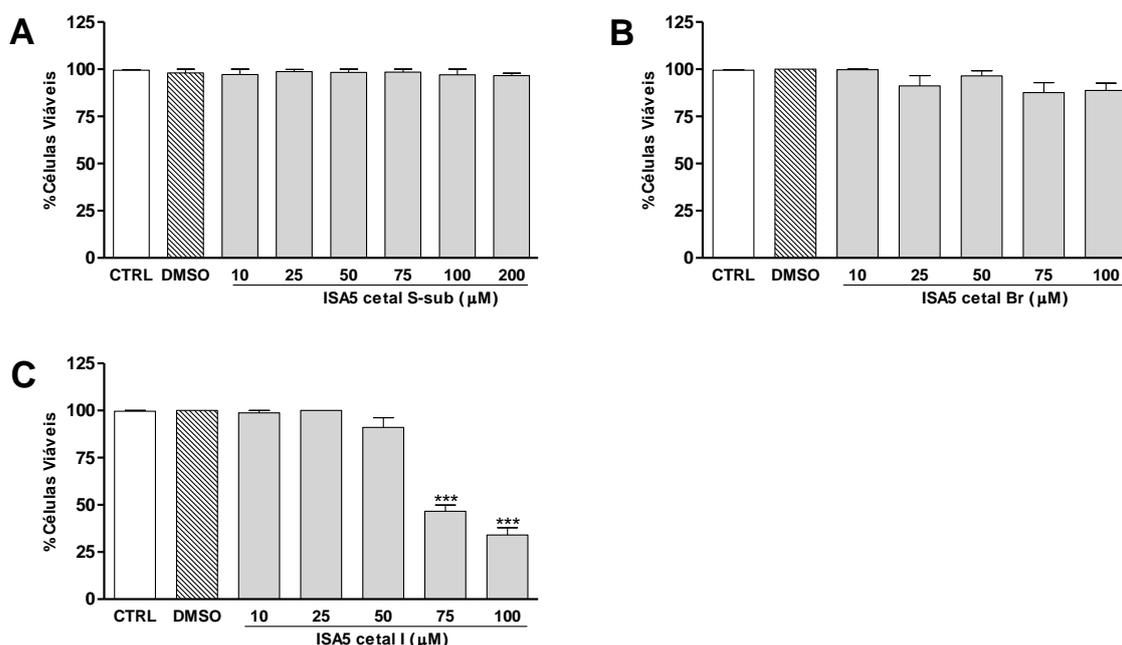
As formas promastigotas foram cultivadas conforme descrito anteriormente e tratadas com derivados cetais de ISA5 em diferentes concentrações. Como pode ser observado, ISA5 cetal sem-Sub não foi ativa contra as formas promastigotas nas concentrações testadas (figura 9A) e ISA5 cetal Br e ISA5 cetal I apresentaram  $IC_{50}$  de 239,59 e 48,32  $\mu M$ , respectivamente (Figura 9B e 9C).



**Figura 9 - Efeito leishmanicida de ISA5 (Cetais) em *Leishmania amazonensis*.** Promastigotas foram tratadas com (A) ISA5 cetal sem-Sub, (B) ISA5 cetal Br e (C) ISA5 cetal I nas concentrações indicadas durante 48 horas a 26°C. DMSO (0,6%) foi utilizado como controle do veículo. A viabilidade dos parasitos foi testada com XTT conforme descrito na metodologia. Os resultados são mostrados como média +SEM de três experimentos independentes. \* $P < 0,05$  \*\* $P < 0,01$  \*\*\* $P < 0,0001$  em relação ao controle.

### 5.1.5 Avaliação da Citotoxicidade dos Cetais de ISA5

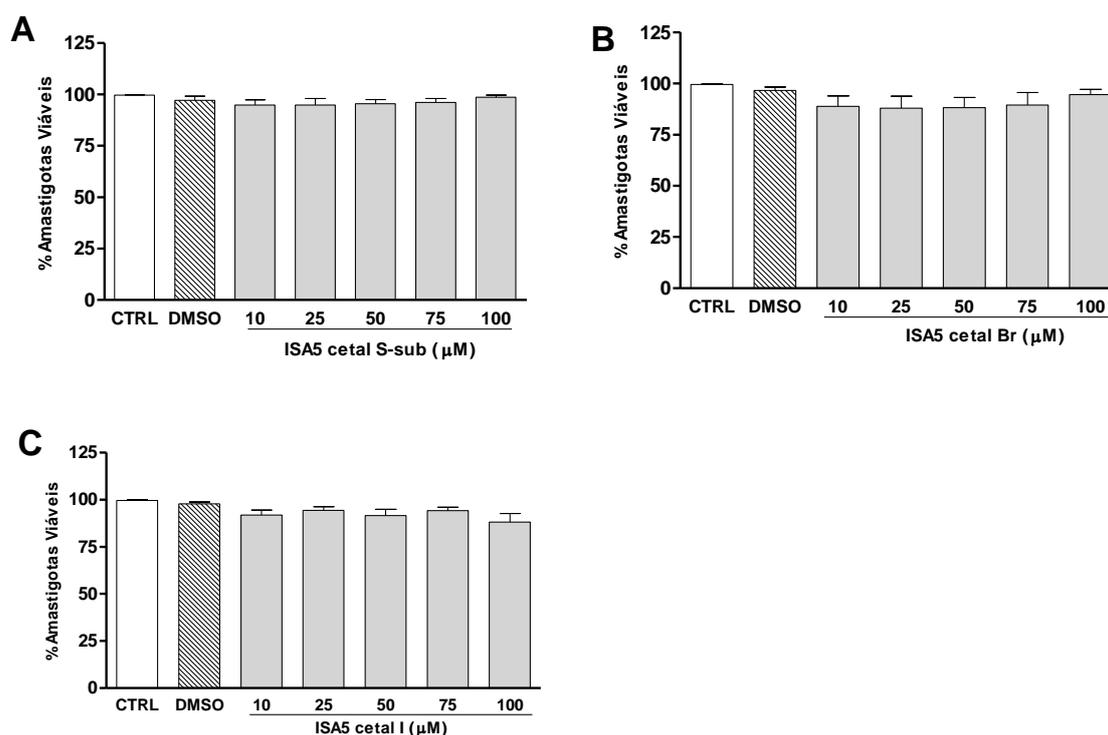
Para verificar a citotoxicidade dos derivados cetais de ISA5 em células da linhagem RAW 264-7 foi utilizado o método do XTT. Nossos resultados mostraram que ISA5 cetal sem-Sub e ISA5 cetal Br não foram tóxicas para as células nas concentrações testadas, enquanto, ISA5 cetal I apresentou 54% e 66% de toxicidade nas concentrações de 75  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , respectivamente (Figura 10).



**Figura 10- Citotoxicidade de ISA5 (Cetais) para células RAW 246-7 *in vitro*.** As células foram tratadas com (A) ISA5 cetal sem-Sub, (B) ISA5 cetal Br e (C) ISA5 cetal I nas concentrações indicadas por 48 horas a 37°C com 5%  $\text{CO}_2$ . A viabilidade foi avaliada utilizando o método de XTT. DMSO (0,6%) foi utilizado como controle do veículo. Os resultados são mostrados como média+SEM de três experimentos independentes. \*\*\* $P < 0,0001$  em relação ao controle.

### 5.1.6 Avaliação da Atividade Anti-amastigota dos Cetais de ISA5

Para avaliar o efeito dos derivados cetais de ISA5 sobre formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, macrófagos de linhagem RAW 264-7 foram infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis*. Nossos resultados evidenciaram que ISA5 cetal sem-Sub, ISA5 cetal Br e ISA5 cetal I não apresentaram atividade leishmanicida nas concentrações testadas (Figura 11).



**Figura 11 - Efeito de ISA5 (Cetais) na sobrevivência de amastigotas de *Leishmania amazonensis* em macrófagos RAW 264-7 *in vitro*.** Macrófagos de linhagem RAW 264-7 foram infectados com promastigotas por 24 horas e posteriormente foram tratados com (A) ISA5 cetal sem-Sub, (B) ISA5 cetal Br e (C) ISA5 cetal I nas concentrações indicadas ou DMSO (0,6%) (controle veículo) durante 24 horas a 37°C/5% CO<sub>2</sub>. A viabilidade dos parasitos foi testada com Alamar blue conforme descrito na metodologia. Os resultados são mostrados como média+SEM de três experimentos independentes.

O índice de seletividade (SI) razão entre o CC<sub>50</sub> em macrófagos e o IC<sub>50</sub> em formas promastigotas de *Leishmania* determina a seletividade de um composto pelo parasito em comparação com a célula hospedeira. Para que um composto tenha maior efeito leishmanicida do que toxicidade para macrófagos, é necessário que o valor do SI seja maior que 1, mostrando que o IC<sub>50</sub> no parasito é menor que o CC<sub>50</sub> em macrófagos (Tiuman *et al.*, 2005). A tabela 1 mostra o IC<sub>50</sub> para as formas promastigotas, o CC<sub>50</sub> para os macrófagos e o cálculo do SI, para isatina e seus derivados. Analisando a tabela é válido destacar que dentre os compostos analisados, apenas os derivados ISA2, ISA4, ISA5, ISA6 e ISA10 apresentaram SI maior que 1, mostrando sua seletividade por promastigotas, em comparação com a célula hospedeira e que ISA10 foi o derivado mais promissor. Isatina e seus derivados não foram utilizados nos demais ensaios pelo fato apresentarem citotoxicidade considerável para os macrófagos RAW 264-7.

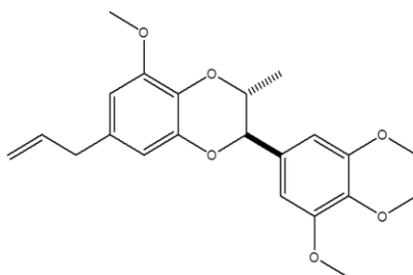
**Tabela 1** - Índice de seletividade para isatina e seus derivados.

Isatina e Derivados	IC <sub>50</sub> – promastigotas (µM)	CC <sub>50</sub> - RAW 264-7 (µM)	SI
ISATINA	-	-	-
ISA2	53,35	64,50	1,22
ISA3	>200,00	77,65	n.a
ISA4	55,03	91,27	1,65
ISA5	28,85	46,97	1,62
ISA6	36,91	46,97	1,27
ISA10	60,40	171,81	2,84
ISA14	81,40	48,49	0,59
ISA15	123,48	37,8	0,29
ISA5 Cetal Sem Sub	-	-	n.a
ISA5 Cetal Bromo	239,59	-	n.a
ISA5 Cetal Iodo	48,32	-	n.a

IC<sub>50</sub> = concentração capaz de matar 50% dos promastigotas; CC<sub>50</sub> = concentração citotóxica para 50% dos macrófagos da linhagem RAW; SI = índice de seletividade. (n.a) = não analisados, (-) = não calculado.

## 5.2 Eusiderina A

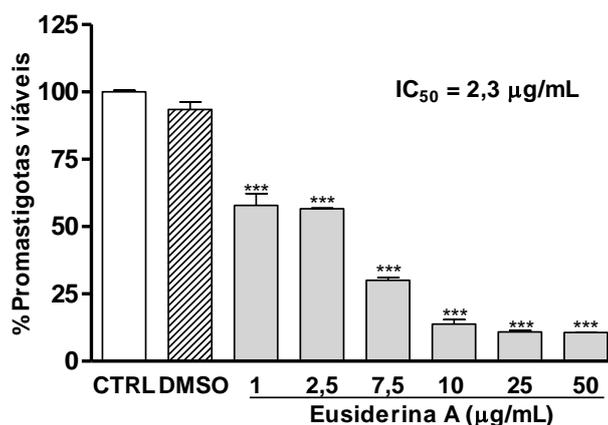
Resultados do nosso grupo em ensaio-bioguiado avaliando o extrato das folhas de *Piper abutiloides* (AL1730F) evidenciaram atividade leishmanicida dose dependente, com IC<sub>50</sub> de 20 µg/mL para promastigotas. O extrato apresentou ainda CC<sub>50</sub> de 50 µg/mL para macrófagos peritoneais murinos. Esse extrato foi então fracionado em duas frações, hexânica (Frhex) e diclorometano (Frdic), cuja atividade anti-promastigota avaliada resultou em IC<sub>50</sub> de 4 µg/ml e 7 µg/ml para Frhex e Frdic, respectivamente (dados não mostrados). Devido a maior atividade da Frhex esta foi sucessivamente fracionada e testada até a identificação da substância eusiderina A (figura 12).



**Figura 12** - Estrutura química de eusiderina A.

### 5.2.1 Avaliação da Atividade Anti-promastigota de Eusiderina A

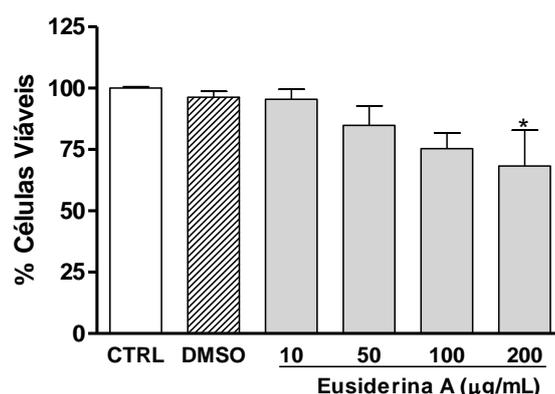
O efeito leishmanicida de eusiderina A foi avaliado inicialmente em formas promastigotas de *L. amazonensis*. Nossos resultados mostraram efeito leishmanicida após o tratamento com eusiderina A nas concentrações de 1; 2,5; 7,5; 10; 25 e 50  $\mu\text{g/mL}$ , inibindo respectivamente, 42, 43, 70, 86, 89 e 89% a sobrevivência dos promastigotas, com  $\text{IC}_{50}$  de 2,3  $\mu\text{g/mL}$  (Figura 13).



**Figura 13** - Efeito leishmanicida de eusiderina A em *Leishmania amazonensis*. Promastigotas foram tratadas com eusiderina A nas concentrações indicadas por 48 horas a 26°C. DMSO (0,6%) foi utilizado como controle do veículo. A viabilidade dos parasitos foi testada utilizando o método de XTT conforme descrito na metodologia. Os resultados são mostrados como média+SEM de três experimentos independentes. \*\*\* $P < 0,0001$  em relação ao controle.

### 5.2.2 Avaliação da Citotoxicidade de Eusiderina A

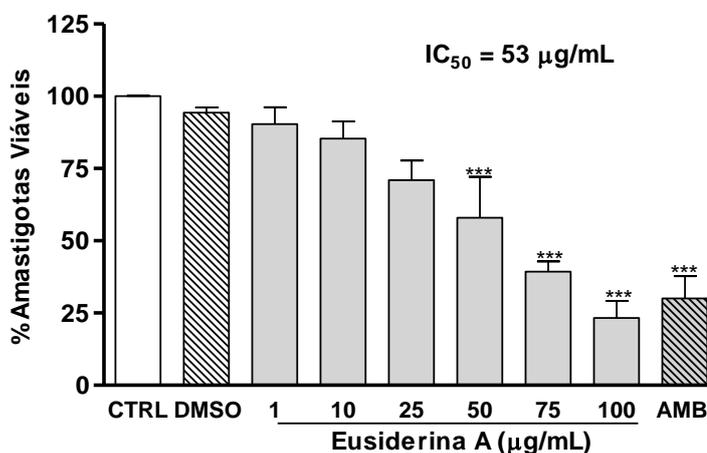
Com o intuito de avaliar o efeito citotóxico do composto para macrófagos, consideradas como as principais células hospedeiras de *Leishmania*, realizou-se o ensaio de viabilidade com macrófagos murinos, pelo método do XTT. Como pode ser observado na figura 14, eusiderina A não apresentou toxicidade para os macrófagos murinos até a concentração de 100  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 14 - Citotoxicidade de eusiderina A para macrófagos peritoneais *in vitro*.** As células foram tratadas com eusiderina A nas concentrações indicadas por 48 horas a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. A viabilidade foi medida utilizando o método de XTT. DMSO (0,6%) foi utilizado como controle do veículo. Os resultados são mostrados como média+SEM de três experimentos independentes. \* $P < 0,05$  em relação ao controle.

### 5.2.3 Avaliação da Atividade Anti-amastigota Intracelular de Eusiderina A

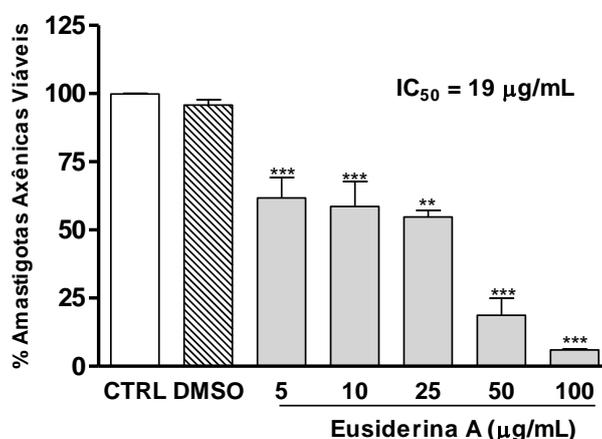
Visto a baixa toxicidade de eusiderina A e efetiva atividade em promastigotas de *L. amazonensis*, seguimos com a avaliação agora testando formas amastigotas intracelulares. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com eusiderina A nas concentrações de 50, 75 e 100 µg/mL inibiu o crescimento dos amastigotas em 42, 60 e 77% respectivamente, apresentando um IC<sub>50</sub> de 53 µg/mL (Figura 15).



**Figura 15 - Efeito de eusiderina A em amastigotas de *Leishmania amazonensis* em macrófagos *in vitro*.** Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foram infectados com promastigotas por 24 horas e posteriormente foram tratados com eusiderina A nas concentrações indicadas ou com 1 µg/mL de anfotericina B (AMB) ou 0,6% DMSO (controle veículo) durante 24 horas a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. A viabilidade dos parasitos foi testada com Alamar blue conforme descrito na metodologia. Os resultados são mostrados como média+SEM de três experimentos independentes. \*\*\* $P < 0,0001$  em relação ao controle.

### 5.2.4 Avaliação da Atividade de Eusiderina A contra Amastigotas Axênicas

O efeito de eusiderina A em formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis* foi avaliado por meio da determinação da viabilidade dos parasitos utilizando o método de Alamar blue. As diferentes concentrações de eusiderina A mostraram atividade significativamente maior do que contra amastigotas intracelulares. Na figura 16, observa-se que todas as concentrações avaliadas foram capazes de diminuir o número de parasitos, quando comparado ao controle não tratado, sendo que nas concentrações de 50 e 100  $\mu\text{g/mL}$  houve uma inibição de 81 e 94%. Eusiderina A apresentou atividade concentração dependente com  $\text{IC}_{50}$  de 19  $\mu\text{g/mL}$ .



**Figura 16 - Atividade leishmanicida para amastigotas axênicas.** Amastigotas axênicas foram tratadas com eusiderina A ou 0,6% DMSO (controle veículo) por 48 horas a 34°C com 5% de  $\text{CO}_2$  e a sobrevivência foi avaliada pelo método de Alamar Blue. Os resultados são mostrados como média+SEM de três experimentos independentes. \*\*\* $P < 0,001$  em relação ao controle.

### 5.2.5 Análise do Ciclo Celular

Para verificar o mecanismo de morte celular nos parasitos, primeiramente avaliamos se eusiderina A seria capaz de afetar o ciclo celular. Analisando os resultados obtidos (Tabela 2) verifica-se que eusiderina A na concentração 10  $\mu\text{g/mL}$  induziu uma ligeira diminuição de cerca de 5,33% no número de células na fase G0/G1 (de 36,25% para 30,92%) e de 5% em G2/M (26,14% para 21,14%) em relação ao controle não tratado. Eusiderina A não induziu alteração significativa na população SubG0 e S. Miltefosina (30  $\mu\text{M}$ ) usada como controle positivo, afetou significativamente o ciclo celular com uma diminuição de 32% e 18% do números de células em G0/G1 e G2/M, respectivamente, enquanto o número de células nas fase SubG0/G1 aumentou 11,6 vezes em relação ao controle não tratado. Os resultados parecem indicar que eusiderina A influencia minimamente o ciclo celular de *L. amazonensis*,

não sendo a inibição da proliferação dos promastigotas o principal mecanismo de atividade de eusiderina A.

**Tabela 2** - Efeitos de eusiderina A no ciclo celular de *Leishmania amazonensis*

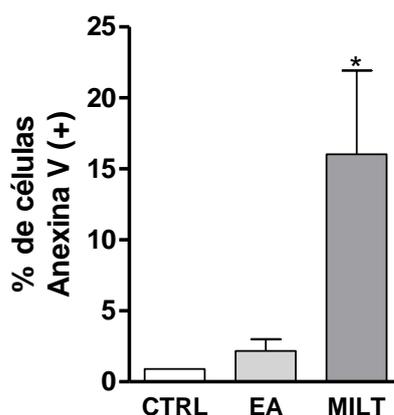
TRATAMENTO	% DE CÉLULAS NAS FASES DO CICLO CELULAR				
	SubG0	G0/G1	S	G2/M	Hiperplóidia
CTRL	1.370±0.020	36.255±0.945	9.140±0.020	26.145±1.055	27.090±2.000
Miltefosina	15.925±0.875***	24.640±2.660***	10.985±1.815	21.355±4.145*	27.095±9.495
Eusiderina A	2.515±0.0750	30.920±2.080*	5.915±0.875	21.145±1.995*	39.505±10.697

Promastigotas de *L. amazonensis* foram tratados ou não com eusiderina A (10 µg/mL) e miltefosina (30µM) durante 48 h, marcados com PI e analisados em citômetro de fluxo. 10.000 eventos foram analisados com o software CellQuest. Os resultados mostrados são a média ± erro padrão da média (SEM) de quatro experimentos independentes. \*P<0.05 e \*\*\*P<0,0001 em relação ao controle não tratado.

### 5.2.6 Detecção de Ligantes de Anexina V em Promastigotas de *Leishmania amazonensis*

Anexina V é uma proteína que se liga a fosfolípeos e o PI é um corante vital que se liga ao núcleo celular, emitindo fluorescência ao se ligar ao DNA e é amplamente usado no estudo de morte celular, pois não penetra quando a membrana celular está íntegra e, portanto, diferencia células normais de células apoptóticas e necróticas (Aubry *et al.*, 1999).

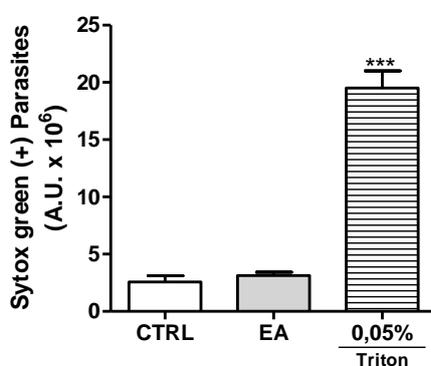
Como mostrado na Figura 17, o tratamento com eusiderina A (10 µg/mL) não afetou a porcentagem de células positivas para anexina V quando comparados ao controle. Por outro lado, 30 µM de miltefosina induziu um aumento de aproximadamente 18 vezes na expressão do ligante de anexina V na membrana dos promastigotas.



**Figura 17**– Ligante de Anexina V em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com eusiderina A. As formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* foram tratadas com 10 µg/mL eusiderina A (EA) e 30µM de miltefosina (MILT) durante 48 horas a 26°C. Porcentagem de promastigotas positivas para Anexina-V, mostrado como média±erro padrão da média (SEM) de três experimentos independentes. \* P<0,05 em relação ao controle.

### 5.2.7 Avaliação da Integridade da Membrana de *Leishmania amazonensis*

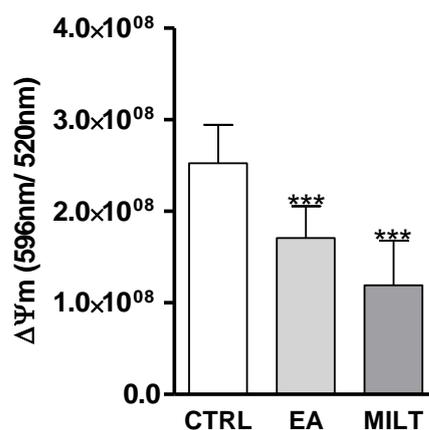
Utilizamos ensaios com marcação com SYTOX Green para avaliar a integridade da membrana plasmática dos parasitos tratados. A membrana plasmática da *Leishmania* é impermeável a essa sonda, porém quando há alteração em sua integridade ocorre a entrada da sonda nas células e a mesma interage com os ácidos nucleicos possibilitando a detecção de fluorescência por fluorímetro (Thevissen *et al.*; 1999). Nossos resultados comprovam que eusiderina A (10 µg/mL) não induz alterações na integridade da membrana plasmática de *L. amazonensis*. Triton X-100 usado como controle reduziu a integridade da membrana significativamente (Figura 18).



**Figura 18- Avaliação da integridade da membrana de promastigotas de *L. amazonensis* tratados com eusiderina A.** Promastigotas foram tratadas ou não com 10 µg/mL de eusiderina A (EA) por 48 horas a 26°C. As células foram marcadas com SYTOX Green. Triton X100 0,05% foi utilizado como controle positivo. Os valores representam a média de três experimentos independentes + SEM. \*\*\*P<0,0001, comparado ao controle.

### 5.2.8 Avaliação do Potencial de Membrana Mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ )

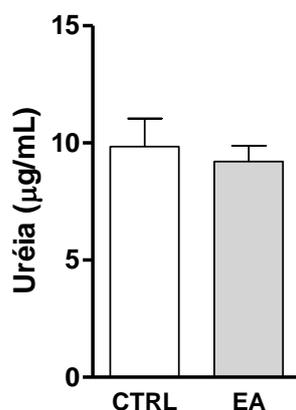
Variações no potencial de membrana mitocondrial estão associadas com a morte de tripanossomatídeos como *Leishmania* e *T. cruzi* (Fonseca-Silva *et al.*, 2011; De Macedo-Silva *et al.*, 2011). Para avaliar alterações no  $\Delta\Psi_m$  das formas promastigotas do parasito após serem submetidos ao tratamento com 10 µg/mL de eusiderina A, utilizamos a sonda Jc-1. Os resultados obtidos nesse experimento demonstram que eusiderina A induziu uma perda significativa do  $\Delta\Psi_m$  com redução de 32,5% comparada ao controle não tratado. Miltefosina foi utilizada como controle positivo do experimento, e reduziu 53% o  $\Delta\Psi_m$  comparado ao controle não tratado (Figura 19).



**Figura 19 – Avaliação potencial de membrana mitocondrial em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com eusiderina A.** Promastigotas foram tratadas ou não com 10 µg/mL de eusiderina A (EA) e 30µM miltefosina (MILT) durante 48 horas a 26°C. O potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) foi avaliado através do kit de detecção de potenciais de membrana mitocondrial JC-1. Os valores representam a média de três experimentos independentes  $\pm$  SEM. \*\*\* P <0.0001, comparado ao controle.

### 5.2.9 Atividade de Arginase em *Leishmania amazonensis*

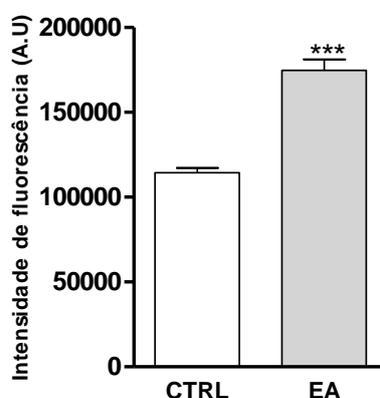
Na *Leishmania* a síntese de poliaminas é essencial para o crescimento do parasito e manutenção da infecção no hospedeiro vertebrado. A enzima arginase tem um papel importante na síntese de poliaminas por ser capaz de hidrolisar arginina em ornitina e ureia, sendo ornitina produto essencial para via de síntese das poliaminas (Roberts *et al.*; 2004, Rogers *et al.*, 2009). Em nossos estudos analisamos a atividade da arginase em promastigotas tratados com 10 µg/mL de eusiderina A. Nossos resultados evidenciaram que o efeito de eusiderina A independe da atividade da arginase, uma vez que, o tratamento foi incapaz de alterar a atividade da enzima (Figura 20).



**Figura 20 - Análise da atividade de arginase em *L. amazonensis* na presença de eusiderina A.** Promastigotas foram tratadas ou não com 10 µg/mL de eusiderina A (EA) por 48 horas a 26°C. Em seguida, as células foram processadas como descrito na metodologia. A atividade da arginase foi medida pela geração de uréia a 540 nm. Os valores representam a média de três experimentos independentes + SEM.

### 5.2.10 Avaliação do Perfil Lipídico em Promastigotas de *Leishmania amazonensis*

Uma característica da morte de parasitos induzida por diversas substâncias naturais é o acúmulo de corpos lipídicos no citoplasma, compostos em grande parte por lipídios neutros (Boren & Brindle, 2012). O acúmulo de lipídios neutros em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com eusiderina A foi determinado por meio da marcação com Nile red, que é uma substância lipofílica, capaz de se ligar a lipídios neutros intracelulares. Há uma correlação linear entre a sua fluorescência e o conteúdo de lipídios neutros nas células (Alemán-Nava *et al.*, 2016). Nossos resultados demonstraram que o tratamento com 10 µg/mL de eusiderina A induz um aumento significativo do acúmulo de lipídios neutros quando comparado ao controle não tratado (figura 21).

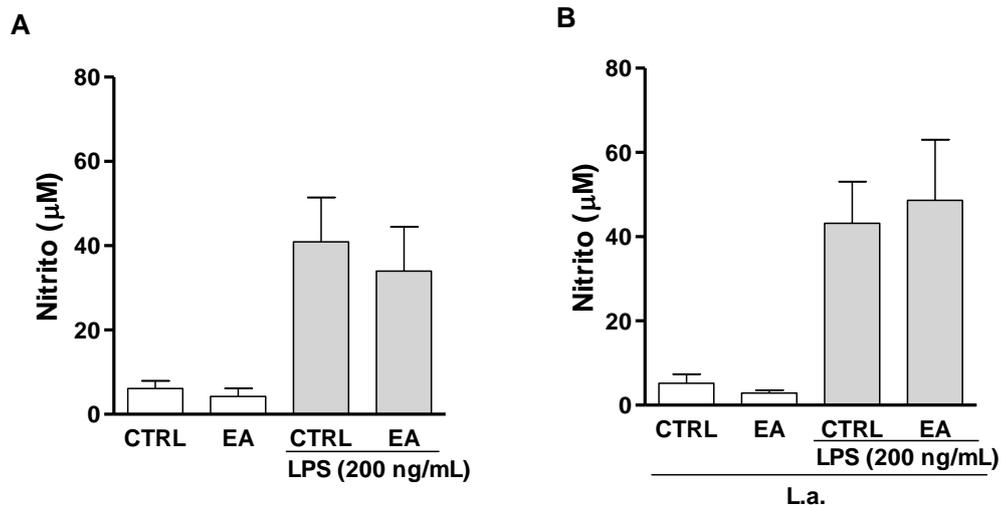


**Figura 21 – Acúmulo de lipídios neutros em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com eusiderina A.** Promastigotas foram tratados ou não com 10 µg/mL de eusiderina A (EA) durante 48 horas a 26°C. Em seguida, as células foram marcadas com Nile Red. Os resultados representam a média + SEM de 2 experimentos independentes. \*\*\* P < 0.0001, comparado ao controle.

### 5.2.11 Produção de Óxido Nítrico por Macrófagos Infectados com *L. amazonensis*

A produção de óxido nítrico (NO) se dá após a ativação da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que está pouco expressa em macrófagos não ativados (Korhonen *et al.*, 2005). Os macrófagos utilizam essa via para eliminar microrganismos fagocitados, em especial parasitos, como a *Leishmania* (Bogdan, 2001; Korhonen *et al.*, 2005). Com o objetivo de avaliar se a morte das amastigotas intracelulares estaria relacionada à ativação dos macrófagos, mensuramos a produção de NO por estas células. O tratamento dos macrófagos com 26 µg/mL eusiderina A não interferiu na produção de NO, entretanto, a estimulação com LPS tenha aumentado 6,8 vezes a concentração de nitrito em relação às células não

estimuladas, o tratamento com eusiderina A não afetou a produção de nitrito estimulada por LPS (Figura 22A). A produção de NO também foi quantificada em macrófagos infectados com *Leishmania* (Figura 22B). Assim como demonstrado para macrófagos não infectados, o tratamento com eusiderina A não alterou o padrão de produção de NO em macrófagos infectados estimulados ou não com LPS (Figura 22B). Estes resultados sugerem que a atividade anti-amastigota do composto seja independente da produção de NO.

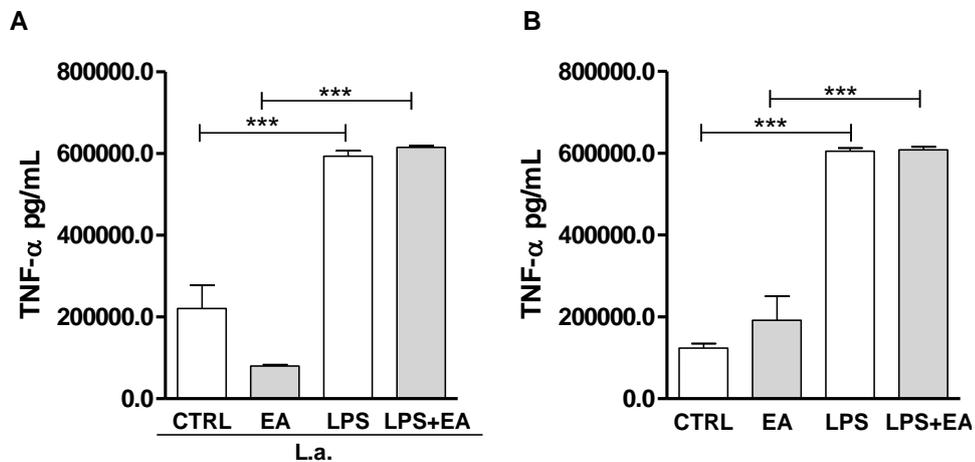


**Figura 22 - Efeito de eusiderina A na produção de óxido nítrico (NO).** Macrófagos peritoneais murinos não infectados (A) ou infectados (B) com *Leishmania amazonensis*(10:1), estimulados ou não com 200 ng/mL de LPS foram incubados na presença ou ausência de 26 µg/mL de eusiderina A (EA) a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. Após 48 horas o sobrenadante foi coletado para avaliar a produção de NO pelo método de Griess. Resultados de 3 independentes experimentos em triplicatas são mostrados como média + SEM.

### 5.2.12 Produção de TNF- $\alpha$ por Macrófagos Infectados com *Leishmania amazonensis*

TNF- $\alpha$  é uma citocina importante para produção de NO pelos macrófagos e consequentemente para eliminação da *Leishmania* (Roma *et al.*, 2016), nesse sentido investigamos se eusiderina A modularia a expressão desta citocina em macrófagos infectados ou não com *L. amazonensis*. Macrófagos murinos infectados ou não e estimulados ou não com LPS foram tratados com eusiderina A na concentração de 26 µg/mL. Nossos dados demonstram que o tratamento de macrófagos infectados ou não com eusiderina A foi incapaz de alterar significativamente os níveis basais de TNF- $\alpha$  (Figura 23A-B). O estímulo dos macrófagos infectados ou não com LPS também não modulou a produção de TNF- $\alpha$  (Figura

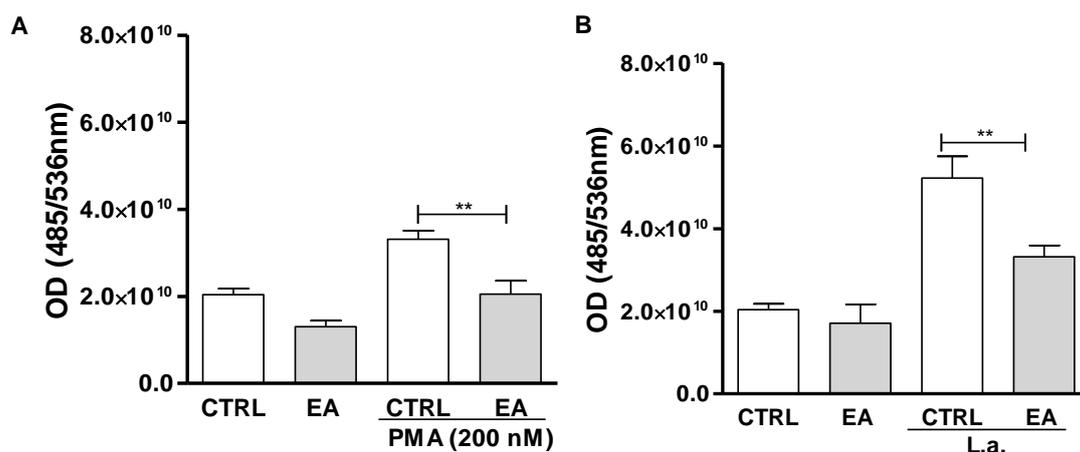
23A-B). A ausência de modulação dos níveis de TNF- $\alpha$  por eusiderina A corrobora com os resultados demonstrados para produção de NO observados anteriormente (Figura 22).



**Figura 23 - Produção de TNF- $\alpha$ .** Macrófagos murinos infectados (10:1 por 24horas) (A) ou não (B), estimulados ou não com 200 ng/mL de LPS foram tratados ou não com 26  $\mu$ g/mL de eusiderina A (EA) a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. A produção de TNF- $\alpha$  foi determinada por ELISA específico após 48 horas de tratamento. Os dados representam a média+ SEM de 2 experimentos em triplicata \*\*\*P<0.0001.

### 5.2.13 Produção de ROS por Macrófagos Tratados com Eusiderina A

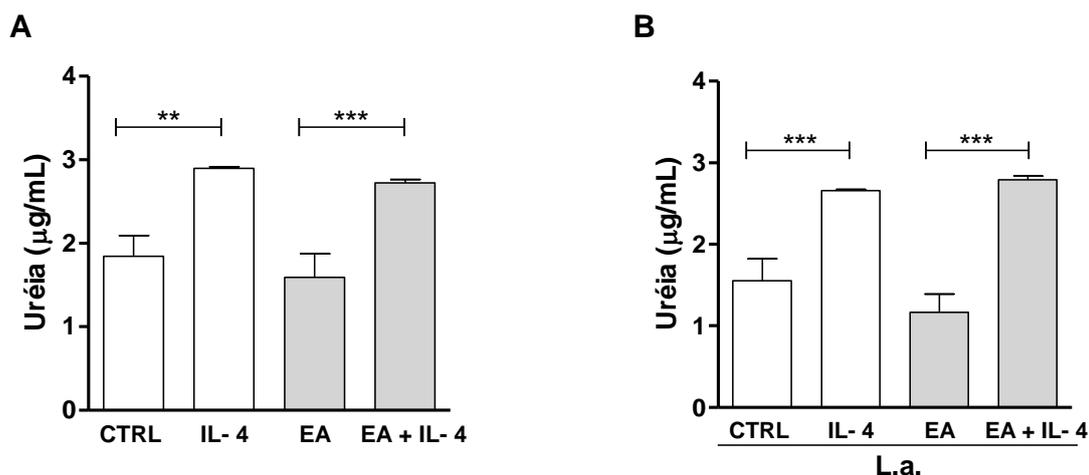
Outro mediador importante da morte dos parasitos no interior dos macrófagos são as espécies reativas de oxigênio (ROS). O tratamento por 30 min com 26  $\mu$ g/mL de eusiderina A foi capaz de reduzir os níveis da produção de ROS em 37% e 36% nos macrófagos estimulados com PMA ou infectados com *L. amazonensis*, respectivamente (Figura 24A-B). Por outro lado, a produção basal de ROS se manteve inalterada após tratamento com eusiderina A. Nossos dados indicam que o efeito leishmanicida de eusiderina A não é mediado pela indução de ROS.



**Figura 24 - Efeitos da eusiderina A na produção de ROS por macrófagos peritoneais murinos.** Macrófagos não infectados (A) ou infectados (10:1 por 24 horas) (B) estimulados ou não com PMA (200 ng/mL) foram incubados na presença ou ausência de 26 µg/mL de eusiderina A (EA) por 30 minutos a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. A produção de ROS foi mensurada através da intensidade de fluorescência, medida em 500/526 nm de excitação/emissão em fluorímetro. Os dados representam a média + SEM de três experimentos independentes. \*\* P <0,001 entre as barras indicadas.

#### 5.2.14 Avaliação da Atividade da Arginase em Macrófagos Tratados com Eusiderina A

Por ser essencial para manutenção da infecção e crescimento do parasito a atividade da arginase constitui um importante alvo a ser investigado (Acuña, *et al.*, 2017). Nesse sentido, avaliamos a atividade de arginase em lisados de macrófagos peritoneais murinos tratados ou não com eusiderina A por 48 horas. Os resultados mostraram que eusiderina A não foi capaz de alterar a atividade da arginase em macrófagos com ou sem o estímulo de IL-4 e infectados ou não com *L. amazonensis* em relação ao controle não tratado (Figura 25 A-B).



**Figura 25 – Análise da atividade da arginase em lisados de macrófagos murinos.** Os macrófagos não infectados (**A**) ou infectados (10:1 por 24 horas) com *Leishmania amazonensis* (**B**), estimulados ou não com 20 ng/mL de IL-4 e tratados ou não com 26 µg/mL de eusiderina A (EA) por 48 horas a 37°C com 5% CO<sub>2</sub>. Os valores representam a média + SEM de três experimentos independentes. \*\* P < 0,001 e \*\*\* P < 0,0001 para as barras indicadas.

## 6- DISCUSSÃO

Doenças negligenciadas como a leishmaniose continuam a afetar milhões de pessoas, gerando sérios problemas para a saúde pública. Não existe vacina disponível para o tratamento da leishmaniose e o controle da doença é baseado na quimioterapia (Rajasekaran & Chen, 2015). Entretanto, existe uma série de problemas com relação aos medicamentos em uso clínico, pois causam sérios efeitos colaterais, possuem toxicidade elevada, alto custo, além de relatos de resistência dos parasitos (Andrews *et al.*, 2014). Essas limitações representam obstáculos para o sucesso da terapia e destacam a necessidade do desenvolvimento de novos medicamentos, mais efetivos, menos tóxicos e com menor custo para o tratamento da leishmaniose. Na busca de melhores fármacos leishmanicidas, produtos provenientes de plantas estão ganhando importância por sua vasta disponibilidade, biodiversidade e por constituírem uma importante fonte de novas substâncias.

Na busca por compostos potencialmente ativos contra *Leishmania*, nosso grupo tem investigado ao longo dos anos várias substâncias oriundas de produtos naturais ou baseadas em produtos naturais. Neste contexto, nosso estudo avaliou o potencial leishmanicida de isatina e seus derivados e de eusiderina A isolada de *Piper abutiloides*.

A isatina tem se mostrado como um agente promissor para o descobrimento de novos fármacos uma vez que tem um baixo custo de produção e possui uma estrutura que permite a realização de modificações químicas em sua estrutura para síntese de novas substâncias (Maroñas *et al.*, 2008; Gabriel *et al.*, 2011). O papel de isatina e seus derivados na infecção por *Leishmania* têm sido pouco explorados (Pervez *et al.*, 2014).

Em nosso estudo, a triagem inicial reunindo isatina e seus dezesseis derivados apontou que os derivados ISA4, ISA5, ISA6 e ISA10 eram os mais ativos, enquanto, isatina não apresentou atividade leishmanicida.

Khan e colaboradores (2008) avaliaram o potencial anti-*Leishmania in vitro* de 20 bases de Schiff derivadas de isatina. Entre os 20 compostos sintetizados 5 (2-Bromofenilimino)-1H-indole-2-ona) e 7 (4-Bromofenilimino)-1H-indole-2-ona) deste estudo foram os mais ativos (IC<sub>50s</sub> de 22,7 nM e 1,84 nM, respectivamente), contra promastigotas de *Leishmania major*. Assim como esses compostos ativos, ISA5 também apresenta Br em sua estrutura, mas ISA5 apresentou um IC<sub>50</sub> de 28,85 µM, muito superior ao dos compostos do estudo de Khan e colaboradores (2008). Essa atividade superior encontrada nos derivados de isatina pode ser devido à formação do grupo funcional imina que ocorre na síntese de uma base de Schiff, pois apenas a formação do grupo funcional em uma isatina com a ausência do Br, composto 1 (fenilimino)-1H-indole-2-one) foi capaz de gerar atividade com um IC<sub>50</sub> de 3,8 nM em promastigotas de *Leishmania major*, enquanto nós não observamos atividade alguma de isatina em concentrações bem superiores em promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Khan e colaboradores (2008) avaliaram a ação de seus derivados em formas promastigotas, mas não demonstraram se essas substâncias são seguras para a célula hospedeira.

Entre os derivados de isatina sintetizados que testamos ISA10 foi o que apresentou menor toxicidade para as células hospedeiras e embora tenha apresentado atividade contra promastigotas e amastigotas com um considerável valor de SI (2,84), nossos dados apontam que o intervalo entre o efeito anti-amastigota e a citotoxicidade de ISA10 é um fator limitante para utilização deste derivado como uma substância leishmanicida.

Na tentativa de diminuir a toxicidade de ISA5, derivado que apresentou melhor atividade anti-promastigota entre os testados, novas derivações foram realizadas dando origem aos ISA5 cetal sem-Sub, ISA5 cetal Br e ISA5 cetal I. Entre os derivados provenientes de ISA5, ISA5 cetal sem-Sub e ISA5 cetal Br reduziram a citotoxicidade demonstrando CC<sub>50</sub>

em concentrações acima de 200  $\mu\text{M}$  e 100  $\mu\text{M}$ , respectivamente, entretanto a atividade anti-promastigotas não foi melhorada, uma vez que, os  $\text{IC}_{50}$  encontrados para ISA5 cetel sem-Sub, ISA5 cetel Br e ISA5 cetel I foram de  $>200 \mu\text{M}$ , 239,6  $\mu\text{M}$  e 48,32  $\mu\text{M}$ , respectivamente. O efeito sobre amastigotas não foi observado em nenhuma das concentrações testadas dos derivados de ISA5, embora a atividade anti-amastigota de ISA5 cetel sem-Sub e ISA5 cetel Br deva ser testadas em concentrações maiores do que as estudadas aqui, desde que não sejam tóxicas para célula hospedeira.

O potencial leishmanicida *in vitro* de uma série de 29  $N^4$ -substituídos 5-nitroisatin-3-tiossemicarbazonas foi avaliado contra promastigotas de *L. major*, e 14 desses compostos foram ativos com valores de  $\text{IC}_{50\text{s}}$  variando de 0,44 a 32,38  $\mu\text{g/mL}$  (Pervez *et al.*, 2014). As derivações realizadas em nosso estudo geraram 10 substâncias ativas contra promastigotas de *L. amazonensis* com  $\text{IC}_{50\text{s}}$  que variam de 8,8 a 64,44  $\mu\text{g/mL}$ .

Nossos resultados e os relatos da literatura demonstram que apesar da ausência de atividade demonstrada, isatina é uma importante molécula modelo para o desenvolvimento de substâncias com atividade anti-*Leishmania*, uma vez que sua fácil derivação pode gerar novas substâncias ativas.

A espécie *Piper abutiloides*, pertencente à família Piperaceae se destaca pela produção de metabólitos secundários, que podem interagir com fungos e bactérias (Johann *et al.*, 2009). Várias classes de metabólitos foram isoladas de espécies de *Piper* como amidas (Dyer & Palmer, 2004), alcalóides (Ee *et al.*, 2009), lignanas (Martins *et al.*, 2003) e neolignanas (Parmar *et al.*, 1997). As neolignanas possuem uma diversidade de atividades biológicas dentre as quais se inclui atividade leishmanicida (Barata *et al.*, 2000). Surinamensina e 3,4-dimetoxi-8-[30-metoxi-40-(E)-propenilfenoxi]-propiofenona, neolignanas isoladas de *Virola surinamensis* e *Virola pavonis*, respectivamente, foram ativos contra amastigota de *L. donovani* a 100  $\mu\text{M}$ , mas também tóxico para macrófagos não mostrando seletividade no modelo de infecção *in vitro* (Barata *et al.*, 2000).

Em nosso estudo avaliamos a atividade leishmanicida de eusiderina A, uma neolignana para a qual já foi reportada atividade antifúngica (Syamsurizal & Afrida, 2012; Syamsurizal & Afrida, 2014; Muhaimin *et al.*, 2017). Eusiderina A demonstrou atividade antifúngica contra vários fitopatógenos como *Coriolus versicolor*, *Tyromeces polutris* (Syafii *et al.*, 1987), *Fusarium oxysporum f.sp. Lycopersicon*, *Sclerotium rolfsii* e *Rhizoctonia solani* (Syamsurizal & Afrida, 2014; Muhaimin *et al.*, 2017).

Avaliando o efeito de eusiderina A sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* demonstramos que essa neolignana possui efeito inibitório sobre o crescimento do parasito, concentração-dependente com IC<sub>50</sub> de 2,3 µg/mL (5,9 µM).

Suzuki e seu grupo (2009) avaliaram a atividade leishmanicida contra promastigotas de *L. major* de sete neolignanas isoladas de *Ocimum sanctum* e todas inibiram o crescimento do parasito com valores de IC<sub>50</sub> variando de 9,1 a 89,7 µg/mL, inferiores ao encontrado em nosso estudo com eusiderina A. Nérís e colaboradores (2013) evidenciaram que a neolignana sintética licarina A inibiu o crescimento de promastigotas de *L. major* apresentando um IC<sub>50</sub> de 9,59 µg/mL. Da mesma forma foi demonstrado a atividade anti-promastigotas de *L. amazonensis* de eupomatenoide-5, uma neolignana isolada de folhas de *Piper regnellii* var. com IC<sub>50</sub> de 9,0 µg/mL (Vendrametto *et al.*; 2010), e da neolignana 2,3-dihydrobenzofurano, um constituinte da própolis com IC<sub>50</sub> de 1,04 µM (De Castro *et al.*, 2017). Nossos resultados demonstram que eusiderina A apresenta atividade anti-promastigotas superior a outras neolignanas estudadas.

Uma vez que eusiderina A apresentou atividade significativa contra promastigotas, com baixo valor de IC<sub>50</sub>, avaliamos sua atividade citotóxica contra macrófagos peritoneais murinos. Nossos dados sugerem que eusiderina A apresenta CC<sub>50</sub> ≥ 100 µg/mL (≥ 259 µM).

A toxicidade de neolignanas para macrófagos murinos foi testada para a neolignana 2,3-dihydrobenzofurano, e esta não foi tóxica para macrófagos de BALB/c até a concentração de 13 µM (De Castro *et al.*, 2017). Testes de citotoxicidade com a neolignana licarina A revelaram que não houve alteração na viabilidade de macrófagos murinos até a concentração de 200 µg/mL (Nérís *et al.*, 2013).

Até o momento, há poucos estudos avaliando a citotoxicidade de neolignanas para macrófagos murinos. Assim, este é, possivelmente, o primeiro estudo a avaliar a citotoxicidade de eusiderina A em macrófagos de BALB/c. Os dados aqui apresentados apontam para uma baixa citotoxicidade sobre esta linhagem celular.

O modelo experimental de amastigotas internalizadas em macrófagos é o que melhor retrata a infecção como ocorre no hospedeiro (Carneiro *et al.*, 2012). Dessa forma, as substâncias que são capazes de reduzir a infecção nessas células parasitadas por *Leishmania* são bastante promissoras e relevantes de serem testadas *in vivo*. Nesse estudo eusiderina A demonstrou uma inibição concentração-dependente inibindo 42, 60 e 77% nas concentrações de 50, 75 e 100 µg/mL respectivamente, apresentando um IC<sub>50</sub> de 53 µg/mL (137,3 µM) para

amastigotas intracelulares *in vitro*. Embora não tenhamos conseguido calcular o CC<sub>50</sub> de eusiderina A para os macrófagos, ele será maior do que 200 µg/mL (morte de 32% das células), considerando esse valor, um SI de ~3,77, para amastigotas de *L. amazonensis*. Vale destacar que nesse caso a eusiderina A apresenta um SI maior que 1, mostrando sua seletividade por amastigotas, em comparação com a célula hospedeira.

A atividade de algumas neolignanas contra formas amastigotas intracelulares de *Leishmania* foi demonstrada como, por exemplo, para as lignanas (+) medioresinol e (-) liriioresinol B, que a 60 µg/mL, diminuem em cerca de 60% a infecção de macrófagos murinos infectados com *L. amazonensis* (Sauvain *et al.*, 1996). Estudo semelhante evidenciou a atividade leishmanicida para amastigotas intracelulares *L. amazonensis* da neolignana 2,3-dihydrobenzofurano com IC<sub>50</sub> de 1,43 µM (De Castro *et al.*, 2017) e do eupomatenóide-5 com IC<sub>50</sub> de 5,0 µg/mL (Vendrametto *et al.*, 2010). Nérís e seu grupo (2013) demonstraram que a licarina A foi ativa contra amastigotas intracelulares de *L. major* com um IC<sub>50</sub> de 4,71 µg/mL.

Amastigotas geradas em cultura axênica podem representar uma importante estratégia para os testes com novos compostos, uma vez que se assemelham bastante às amastigotas intracelulares no que diz respeito às características estruturais e propriedades biológicas (Gupta, Goyal, Rastogi, 2001).

Vendrametto e colaboradores (2010) investigaram a atividade leishmanicida de eupomatenóide-5 e demonstraram que esta neolignana apresentou atividade dose-dependente, com IC<sub>50</sub> de 13,0 µg/mL para amastigotas axênicas de *L. amazonensis*. Em nosso estudo, as diferentes concentrações de eusiderina A mostraram atividade significativa contra amastigotas axênicos, inibindo seu crescimento, chegando a inibições de 81 e 94% nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, respectivamente. Eusiderina A apresentou um IC<sub>50</sub> de 19 µg/mL (49,2 µM).

Nota-se, no entanto, que para as formas amastigotas intracelulares, a concentração necessária para matar o parasito foi maior do que para as formas promastigotas e amastigotas axênicas. Apesar das semelhanças entre amastigotas axênicas e amastigotas intracelulares, a diferença nos resultados pode ser explicada pelo fato da substância necessitar transpassar um conjunto de membranas representadas pela membrana plasmática e a membrana do fagolisossomo, local onde se encontra o parasito. Supõe-se então que uma maior concentração seja necessária para atingir o mesmo efeito observado nas formas axênicas.

O nosso estudo mostrou, pela primeira vez, que eusiderina A é ativa contra promastigotas, amastigotas axênicas e intracelulares de *L. amazonensis*. Assim, fez-se oportuno investigar os possíveis mecanismos de ação dessa substância.

A alteração no ciclo celular é uma das características de células que sofrem morte similar a apoptose que ocorre tanto nos metazoários como nos organismos unicelulares (Das, Mukherjee, Shaha, 2001; Horikawa & Peña, 2011; Proto, Coombs & Mottran, 2013; Garcia *et al.*, 2013). Os resultados aqui obtidos demonstram que o tratamento de promastigotas de *L. amazonensis* com eusiderina A induziu uma ligeira diminuição na porcentagem de células nas fases G0/G1 e G2/M em relação ao controle não tratado e que essa neolignana não induziu alteração significativa nas populações SubG0 e S. Os resultados sugerem que o composto influencia minimamente o ciclo celular de *L. amazonensis*, não sendo a inibição da proliferação dos promastigotas o principal mecanismo de atividade de eusiderina A. Nesse sentido, Garcia e colaboradores (2013) ao avaliar a atividade leishmanicida do eupomatenoide-5 em promastigotas de *L. amazonensis*, demonstraram que esta neolignana promoveu *arrest* do ciclo celular na fase G0/G1, indicando morte similar a apoptose.

O potencial de membrana mitocondrial é um importante parâmetro da função mitocondrial usado não apenas como um indicador de viabilidade celular, mas também como indicador de apoptose ou morte incidental (Shaha, 2006; Proto, Coombs & Mottran, 2013). Para melhor elucidar o efeito de eusiderina A sobre a fisiologia da mitocôndria das formas promastigotas de *L. amazonensis* utilizamos o JC-1, que é uma sonda fluorescente capaz de mensurar o  $\Delta\psi_m$  das células viáveis. Nossos dados demonstraram que promastigotas tratadas com eusiderina A tiveram uma redução significativa do seu  $\Delta\psi_m$ , quando comparadas com as células do grupo controle. Como já demonstrado por Pinto-Martinez e colaboradores (2018), miltefosina altera o  $\Delta\psi_m$  de *L. donovani*, nesse sentido utilizamos miltefosina como controle positivo do experimento.

A fim de aprofundarmos nosso conhecimento sobre o modo de ação eusiderina A em *L. amazonensis* e seu potencial como indutora de morte celular, utilizamos anexina-V e o iodeto de propídio (PI) para avaliar alterações nos níveis dos ligantes de anexina-V na membrana dos promastigotas tratados. Nossos resultados demonstraram que o tratamento com eusiderina A não induziu um aumento na exposição dos fosfolipídios ligantes de anexina-V no folheto externo da membrana dos parasitos quando comparados ao controle não tratado. Por outro lado, miltefosina, fármaco capaz de induzir externalização dos fosfolipídios ligantes

de anexina-V em promastigotas de *Leishmania* foi utilizada como controle positivo do experimento, comprovando seu papel nessa indução (Paris, *et al.*, 2004). Existe uma discussão sobre a ocorrência do fosfolipídio fosfatidilserina (PS) em *Leishmania*, alguns estudos relataram a presença de PS em espécies de *Leishmania* (Henriques *et al.*, 2003; Yoneyama *et al.*, 2006) enquanto outros falharam na detecção deste lipídio (Zhang *et al.*, 2007; Sengh *et al.*, 2010). Recentemente, foi demonstrado que diferentes espécies de *Leishmania*, incluindo *L. amazonensis* não expressam fosfatidilserina e que anexina-V detectaria além de PS, outros fosfolipídios na membrana do parasito, como por exemplo, ácido fosfatídico, fosfatidiletanolamina, fosfatidilglicerol e fosfatidilinositol (Weingärtner *et al.*, 2012).

Garcia e colaboradores (2013) avaliando a atividade leishmanicida do eupomatenóide-5 em promastigotas de *L. amazonensis*, demonstraram que esta neolignana levou a uma hipopolarização do potencial de membrana mitocondrial e também aumento da exposição de ligantes de anexina-V nesse parasito.

A síntese de poliaminas é essencial para o crescimento da *Leishmania* (Roberts *et al.*; 2004, Rogers *et al.*, 2009). A arginase é a primeira enzima envolvida na biossíntese de poliaminas e hidrolisa a arginina em ornitina e uréia (Acuña *et al.*, 2017). O bloqueio da arginase pode levar ao estresse oxidativo nas células do parasito e promover o controle da infecção (Colotti & Ilari, 2011). A *Leishmania* torna-se auxotrófica para as poliaminas quando o gene da arginase é deletado, mostrando a importância desta enzima para a sobrevivência do parasito (Reguera *et al.*, 2009). Nesse sentido avaliamos a produção de arginase em *L. amazonensis* tratados com eusiderina A. Nossos resultados mostraram que a produção de arginase não foi alterada após o tratamento com esta neolignana.

A ligação de fármacos ao ergosterol da membrana de *Leishmania*, com consequente alteração da permeabilidade celular e indução de poros foi demonstrada para o antifúngico anfotericina B (Chattopadhyay & Jafurulla, 2011). Para estudar uma possível ação de eusiderina A em *L. amazonensis* utilizamos o SYTOX Green que é incapaz de passar através da membrana plasmática do parasito quando esta se encontra íntegra. Porém quando a membrana apresenta alterações essa molécula entra na célula e se liga ao DNA de forma irreversível, emitindo fluorescência (Thevissen *et al.*, 1999). Nossos dados demonstraram que eusiderina A não induz alterações na integridade da membrana plasmática de *L. amazonensis*. Este fato sugere que promastigotas tratados com eusiderina A parecem não estar morrendo

por necrose, pois uma das características de células em necrose é a alteração da permeabilidade da membrana plasmática com extravasamento de conteúdo intracelular (Jain *et al.*, 2013).

A disfunção mitocondrial pode induzir um acúmulo de corpos lipídicos no interior das células (Lee *et al.*, 2013). Esse acúmulo de lipídios ocorre para tentar suprir o fornecimento de energia, visto que a principal fonte de energia celular, a mitocôndria, está comprometida (Aon, Bhatt, Cortassa, 2014). Nesse sentido, foi avaliado o acúmulo de lipídeos neutros nos promastigotas tratados com eusiderina A e observamos um aumento significativo no acúmulo de lipídios nas células tratadas com essa neolignana. Estudos com a substância Amiodarona sugeriram que o acúmulo de corpos lipídicos após o tratamento pode ser devido a alterações nas propriedades biofísicas da membrana plasmática ou degradação anormal de lipídios (De Macedo-Silva *et al.*, 2011).

Nossos resultados sugerem que eusiderina A pode induzir morte celular não regulada (morte incidental) em promastigotas de *L. amazonensis*, apresentando como alterações celulares características, a alteração do  $\Delta\Psi_m$  e acúmulo de corpos lipídicos, que segundo Proto e colaboradores (2013), constituem características desse tipo de morte.

Macrófagos não são só o habitat dos amastigotas de *Leishmania*, como também a principal célula efetora para sua destruição, além disso, secretam moléculas que estimulam a resposta inflamatória, como citocinas e quimiocinas (Teixeira *et al.*, 2006). Nesse estudo foram avaliados parâmetros de ativação de macrófagos com capacidade microbicida (indução da síntese de NO, de ROS e de citocinas) que agem para debelar as infecções por *Leishmania*. A dicotomia existente entre resposta imunológica celular do tipo Th1 e Th2 nos hospedeiros acometidos pela doença, leva a investigação de novas alternativas terapêuticas para descoberta de novos fármacos que não apenas tenham atividade sobre o parasito em si, mas também tenham capacidade imunomodulatória para fazer prevalecer uma resposta imune efetiva do hospedeiro (Islamuddin *et al.*, 2015).

Extratos vegetais, metabólitos secundários ou biomoléculas podem exercer propriedades imunoestimuladoras em diferentes doenças (Chouhan *et al.*, 2014). Acredita-se que o mecanismo mais comum para exercer atividade imunomoduladora seja a estimulação da produção de NO ou ROS que é a principal molécula efetora para a morte de amastigotas de *Leishmania* (Oryan, 2015).

Em camundongos tem sido observado um papel importante da produção de óxido nítrico no processo de morte da *Leishmania* (Evans *et al.*, 1993; Stenger *et al.*, 1994; Assreuy *et al.*, 1994). Choi e colaboradores (2007) investigaram os efeitos do obovatol, uma neolignana isolada das folhas de *Magnolia obovata*, na produção de óxido nítrico (NO) em células RAW 264-7 ativadas por LPS, e mostraram que esta neolignana inibiu significativamente a produção de NO induzida por LPS de uma maneira dependente da concentração. Lee e colaboradores (2013) demonstraram que uma neolignana isolada dos frutos de *Vitex rotundifolia* inibiu a produção de NO induzida por LPS em células de linhagem RAW 264-7. Já a atividade leishmanicida da neolignana 2,3-dihydrobenzofurano conta com a ativação de macrófagos, pois o tratamento com este composto aumenta os níveis de NO (De Castro *et al.*, 2017).

Para avaliar se a atividade leishmanicida de eusiderina A estava associada à produção do NO, macrófagos murinos foram tratados ou não com eusiderina A. Nossos resultados mostraram que macrófagos tratados com eusiderina A não tiveram seu padrão de produção de NO alterado, mesmo quando estimulados com LPS, e infectados ou não com *L. amazonensis*. Esses resultados sugerem que a atividade anti-amastigota dessa neolignana é independente da produção de NO.

O TNF- $\alpha$  está envolvido na regulação da produção do NO por células infectadas com *Leishmania* sp. A ativação de TNF- $\alpha$  atua como um sinal autócrino para produção de INF- $\gamma$ , que amplifica a produção do NO favorecendo a destruição dos parasitos (Green *et al.*, 1994; Oliveira *et al.*, 2014). Ryu e colaboradores (2001) demonstraram que as neolignanas magnosalina e andamanicina isoladas de folhas de *Perilla frutescens*, inibiram a síntese de NO e TNF- $\alpha$  em células RAW 264-7 ativadas por LPS. Da mesma forma, a neolignana picrasmalignana A isolada do caule de *Picassamas quassioides*, suprimiu a produção de NO estimulada por LPS e a secreção pró-inflamatória da citocina TNF- $\alpha$  de maneira concentração-dependente (Zhao *et al.*, 2013).

Nossos dados demonstraram que essa neolignana não induz alterações na produção de TNF- $\alpha$  em macrófagos estimulados ou não com LPS e, infectados ou não com *L. amazonensis*, quando comparados aos controles não tratados, corroborando com os resultados obtidos para a produção de NO.

Espécies reativas de oxigênio (ROS) protegem o hospedeiro contra um grande número de microrganismos patogênicos e são importantes para a eliminação de uma variedade de

patógenos intracelulares (Roma *et al.*, 2016). Assim, avaliamos a produção de ROS em macrófagos murinos e, nossos resultados mostraram que eusiderina A reduziu a produção de ROS, tanto em macrófagos estimulados com PMA quanto em macrófagos infectados *L. amazonensis*, indicando que o efeito leishmanicida não parece ser mediado pela indução de ROS.

A resposta do tipo Th2 induz a expressão da arginase por macrófagos, e esta enzima é essencial para o crescimento do parasito (Roberts *et al.*, 2004). Avaliamos, então, a atividade da arginase em macrófagos peritoneais murinos tratados com eusiderina A. Os resultados mostraram que eusiderina A não reduziu a atividade da arginase em macrófagos, estimulados ou não com IL-4, e infectados ou não com *L. amazonensis* em relação aos controles não tratados.

Nosso estudo demonstra pela primeira vez a atividade leishmanicida de eusiderina A e sugere que esta neolignana pode ser promissora no desenvolvimento de um novo agente leishmanicida. Convém ressaltar que eusiderina A pode também ter atuação em outros alvos da mitocôndria, bem como em outras organelas do parasito e, portanto, seu efeito leishmanicida parece estar associado a um mecanismo de indução de morte não regulada que apresenta como principais características a alteração do  $\Delta\Psi_m$  e o aumento de corpos lipídicos. Nossos resultados garantem novos estudos para melhor elucidar o mecanismo de ação deste composto em *Leishmania amazonensis*, bem como sua utilização em modelo de infecção *in vivo*.

## 7 – CONCLUSÕES

- Isatina não apresenta atividade contra as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*, mas constitui um importante modelo molecular para o desenvolvimento de substâncias leishmanicidas, uma vez que sua fácil derivação pode gerar novas substâncias ativas;
- ISA10 foi ativa contra formas amastigotas de *L. amazonensis* e não tóxica para macrófagos de linhagem RAW 264-7 até a concentração de 100  $\mu\text{M}$ .
- A derivação de ISA5 em ISA5 cetil Br melhorou sua toxicidade, mas em contrapartida elevou seu  $\text{IC}_{50}$  para promastigotas de *L. amazonensis* e não apresentou efeito sobre amastigotas em nenhuma das concentrações testadas;

- Eusiderina A apresenta efeito concentração-dependente na indução de morte de promastigotas, amastigotas axênicos e intracelulares de *L. amazonensis*;
- Eusiderina A apresenta toxicidade para macrófagos murinos com  $CC_{50} > 200 \mu\text{g/ml}$ ;
- Eusiderina A não afeta, significativamente, o ciclo celular, a expressão de ligante de anexina-V, e a permeabilidade da membrana de promastigotas de *L. amazonensis*;
- Eusiderina A causa morte incidental tendo como característica a alteração do potencial de membrana mitocondrial e o acúmulo de corpos lipídicos neutros em promastigotas de *L. amazonensis*;
- Eusiderina A não modula as funções microbidas dos macrófagos, como produção de NO, ROS, a atividade de arginase e TNF- $\alpha$ .

## 8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Aboul-Fadl, T. & Bin-Jubair, F.A.S. (2010) Anti-tubercular activity of isatin derivatives, Int. J. Res. Pharm. Sci. 1:113.

Acuña, S.M., Aoki, J.I., Laranjeira-Silva, M.F., Zampieri, R.A., Fernandes, J.C.R., Muxel, S.M., Floeter-Winter, L.M. (2017) Arginase expression modulates nitric oxide production in *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Plos One. 11:e0187186.

Afonso, L.C. & Scott, P. (1993) Immune responses associated with susceptibility of C57BL/10 mice to *Leishmania amazonensis*. Infection Immunity. 61:2952.

Akhoundi, M., Downing, T., Votýpka, J., Kuhls, K., Lukeš, J., Cannet, A., Ravel, C., Marty, P., Delaunay, P., Kasbari, M., Granouillac, B., Gradoni, L., Sereno, D. (2017) *Leishmania* infections: Molecular targets and diagnosis. Mol Aspects Med.57:1.

Aleixo, J.A., Nascimento, E.T., Monteiro, G.R., Fernandes, M.Z., Ramos, A.M.O., Wilson, M.E., Pearsons, R.D., Jeronimo, S.M.B. (2006) Atypical American visceral leishmaniasis caused by disseminated *Leishmania amazonensis* infection presenting with hepatitis and adenopathy. Trans R Soc Trop Med Hyg. 100:79.

Alemán-Nava, G.S., Cuellar-Bermudez, S.P., Cuaresma, M., Bosma, R., Muylaert, K., Ritmann, B.E., Parra, R. (2016) How to use Nile Red, a selective fluorescent stain for microalgal neutral lipids. J Microbiol Methods. 128:74.

Alvar, J., Vélez, I.D., Bern, C., Herrero, M., Desjeux, P., Cano, J., Boer, M. E., WHO Leishmaniasis Control Team. (2012) Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. Plos One. 7:35671.

- Andrews, K.T., Fisher, G., Skinner-Adams, T.S. (2014) Drug repurposing and human parasitic protozoan diseases. *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 4:95.
- Anthony, J. P., Fyfe, L. e Smith, H. (2005) Plant active components – a resource for antiparasitic agents? *Trends Parasitol.* .2:462.
- Aon, M.A., Bhatt, N., Cortassa, S.C. (2014) Mitochondrial and cellular mechanisms for managing lipid excess. *Front Physiol.* 5:282.
- Araújo, C. A. C., Alegrio, L. V., Gomes, D. C. F., Lima, M. E. F., Gomes-Cardoso, L., Leon, L. L. (1999) Studies on the effectiveness of diarylheptanoids derivatives against *Leishmania amazonensis*. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, v. 94, n. 6, p. 791.
- Araújo-Vilges, K.M., Oliveira, S.V., Couto, S.C.P., Fokoue, H.H., Romero, G.A.S., Kato, M.J., Romeiro. L.A.S., Leite, J.R.S.A., Kuckelhaus, S.A.S. (2017) Effect of piplartine and cinnamides on *Leishmania amazonensis*, *Plasmodium falciparum* and on peritoneal cells of Swiss mice. *Pharm Biol.* 55:1601.
- Assrey, J., Cunha, F.Q., Epperlein, M., Noronha-Dutra, A., O'Donnell, C.A., Liew, F.Y., Moncada, S. (1994) Production of nitric oxide and superoxide by activated macrophages and killing of *Leishmania major*. *European journal of immunology.* 24:672.
- Aubry, J. P.; Blaecke, A.; Lecoanet-Henchoz, S.; Jeannin, P.; Herbault, N.; Caron, G.; Moine, V. ; Bonnefoy, J. Y. (1999) Annexin V used for measuring apoptosis in the early events of cellular cytotoxicity. *Cytometry.* v. 37, n. 3, p. 197.
- Aveniente, M., Pinto, E.F., Santos, L.S., Rossi-Bergmann, B., Barata, L.E.S. (2007) Structure–activity relationship of antileishmanials neolignana analogues. *Bioorg. Med. Chem.* 15:7337.
- Azeredo-Coutinho, R.B., Conceição-Silva, F., Schubach, A., Cupolillo, E., Quintella, L.P., Madeira, M.F., Pacheco, R.S., Valet-Rosalino, C.M., Mendonça, S.C.(2007) First report of diffuse cutaneous leishmaniasis and *Leishmania amazonensis* infection in Rio de Janeiro State, Brazil. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 101: 735.
- Barata, L. E. S., Santos, L. S. Ferri,P. H. Ferri, Phillipson,J. D. Paine , A., Croft, S. L. (2000) Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues, *Phytochemistry.* 55:589.
- Barral, A., Pedral-Sampaio, D., Grimaldi. Jr. G., Momen, H., McMahon-Pratt, D., De Jesus, A.R., Almeida, R., Badaro, R., Barral-Netto, M., Carvalho, E.M., Johnson, Jr., W.D. (1991) Leishmaniasis in Bahia, Brazil: evidence that *Leishmania amazonensis* produces a wide spectrum of clinical disease. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44:536.

- Barral-Netto, M., Von Sohsten, R.L., Teixeira, M., dos Santos, W.L., Pompeu, M.L., Moreira, R.A., Oliveira, J.T., Cavada, B.S., Falcoff, E. Barral, A. (1996) *In vivo* protective effect of the lectin from *Canavalia brasiliensis* on BALB/c mice infected by *Leishmania amazonensis*. *Acta Trop.* 60:237.
- Barreto, M.L., Teixeira, M.G., Bastos, F.I., Ximenes, R.A., Barata, R.B., Rodrigues, L.C. (2011) Successes and failures in the control of infectious diseases in Brazil: social and environmental context, policies, interventions, and research needs. *Lancet.* 9780:1877.
- Bates, P.A. (2007) Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Intl J Parasitol.* 37:1097.
- Bernuci, K.Z., Iwanaga, C.C., Fernandez-Andrade, C.M., Lorenzetti F.B., Torres-Santos, E.C., Faiões, V.D., Gonçalves, J.E., do Amaral, W., Deschamps, C., Scodro, R.B., Cardoso, R.F., Baldin, V.P., Cortez, D.A. (2016) Evaluation of Chemical Composition and Antileishmanial and Antituberculosis Activities of Essential Oils of Piper Species. *Molecules.* 21:12.
- Besteiro, S.; Williams, R. A. M.; Coombs, G. H.; Mottram, J.C. (2007) Protein turnover and differentiation in *Leishmania*. *Int J Parasitol.* 37:1063.
- Bhattacharya, S.K., Sinha, P.K., Sundar, S., Thakur, C.P., Jha, T.K., Pandey, K., Das, V.R., Kumar, N., Lal, C., Verma, N., Singh, V.P., Ranjan, A., Verma, R.B., Anders, G., Sindermann, H., Ganguly, N.K. (2007) Phase 4 trial of miltefosine for the treatment of Indian visceral leishmaniasis. *J Infect Dis.* 196:591.
- Bogdan, C. (2001) Nitric oxid and the immune response. *Nature immunology*, New York, v. 2, p. 907.
- Boren, J. & Brindle, K.M. (2012) Apoptosis-induced mitochondrial dysfunction causes cytoplasmic lipid droplet formation. *Cell Death Differ.* 9:1561.
- Cabral, M.M.O., Barbosa-Filho, J.M., Maia, G.L.A., Chaves, M.C.O., Braga, M.V., De Souza, W., Soares, R.O. A. (2010) Neolignans from plants in northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against *Trypanosoma cruzi*. *Exp. Parasitol.* 124: 319.
- Carneiro, S.M., Carvalho, F.A., Santana, L.C., Sousa, A.P., Neto, J.M., Chaves, M.H. (2012) The cytotoxic and antileishmanial activity of extracts and fractions of leaves and fruits of *Azadirachta indica* (A Juss.). *Biol Res.* v. 45, n. 2, p.111.
- Chattopadhyay, A. & Jafurulla, M. (2011) A novel mechanism for an old drug: amphotericin B in the treatment of visceral leishmaniasis. *Biochem Biophys Res Commun.* Biochem Biophys Res Commun. 416: 7.
- Chaudhary, D. K., Ahmadb S., Maitya S. and Alam M. S. (2013) Isatin: diverse biological profile. *Der Pharmacia Lettre.* 5: 285.

Chávez-Fumagalli, M.A., Ribeiro, T.G., Castilho, R.O., Fernandes, S.O., Cardoso, V.N., Coelho, C.S., Mendonça, D.V., Soto, M., Tavares, C.A., Faraco, A.A., Coelho, E.A. (2015) New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. *Rev Soc Bras Med Trop.* 48:235.

Choi, M.S., Lee, S.H., Cho, H.S., Kim, Y., Yun, Y.P., Jung, H.Y., Jung, J.K., Lee, B.C., Pyo, H.B., Hong, J.T. (2007) Inhibitory effect of obovatol on nitric oxide production and activation of NF- $\kappa$ B/MAP kinases in lipopolysaccharide-treated RAW 264.7 cells. *Eur J Pharmacol.* 556: 181.

Chouhan, G., Islamuddin, M., Sahal, D., Afrin, F. (2014) Exploring the role of medicinal plant-based immunomodulators for effective therapy of leishmaniasis. *Front Immunol.* 5:193.

Clem A. (2010) A current perspective on leishmaniasis. *J Glob Infect Dis.* 2:124.

Colotti, G. & Ilari, A. (2011) Polyamine metabolism in *Leishmania*: from arginine to trypanothione. *Amino Acids.* 40:269.

Costa, M., Di Stasi, L.C., Kirizawa, M., Mendaçolli, S.L., Gomes, C., Trolin, G. (1989) Screening in mice of some medicinal plants used for analgesic purposes in the state of São Paulo. Part II. *J Ethnopharmacol.* 27:25.

Croft, S. L. & Coombs, G. H. (2003). Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol.* 19: 502.

Croft, S.L., Seifert, K., Yardley, V. (2006) Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J. Med. Res.* 123:399.

Da Silva, J. F., Garden, S. J. & Pinto, A. The Chemistry of Isatins: A Review from 1975 to 1999 (2001). *Chemistry Preprint Archive.* v. 2000, n.10, p. 155.

Da Silva, E.R., Castilho, T.M., Pioker, F.C., Tomich de Paula Silva, C.H., Floeter-Winter, L.M. (2002) Genomic organisation and transcription characterisation of the gene encoding *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase and its protein structure prediction. *Int. J. Parasitol.* 32: 727.

Das, M., Mukherjee, S.B., Shaha, C. (2001) Hydrogen peroxide induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Cell Sci.* 114:2461.

De Castro Oliveira, L.G., Brito, L.M., de Moraes Alves, M.M., Amorim, L.V., Sobrinho-Júnior, E.P., de Carvalho, C.E., da Franca Rodrigues, K.A., Arcanjo, D.D., das Graças Lopes Citó, A.M., de Amorim Carvalho, F.A. (2017) In Vitro Effects of the Neolignan 2,3-Dihydrobenzofuran Against *Leishmania amazonensis*. *Basic Clin Pharmacol Toxicol.* 120:52.

De Macedo-Silva, S.T., de Oliveira Silva, T.L., Urbina, J.A., de Souza, W., Rodrigues, J.C. (2011) Antiproliferative, Ultrastructural, and Physiological Effects of Amiodarone on Promastigote and Amastigote Forms of *Leishmania amazonensis*. *Mol Biol Int.* 2011: 876021.

Delorenzi, J.C., Attias, M., Gattass, C.R., Andrade, M., Rezende, C., da Cunha Pinto, A., Henriques, A.T., Bou-Habib, D.C., Saraiva, E.M. (2001) Antileishmanial activity of an indole alkaloid from *Peschiera australis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 45:1349.

Delorenzi, J.C., Freire-de-Lima, L., Gattass, C.R., de Andrade Costa, D.H. L., Kuehne M.E., Saraiva, E.M. (2002) In vitro activities of iboga alkaloid congeners coronaridine and 18-methoxycoronaridine against *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 46:2111.

De Souza C.S.F., Calabrese, K.S., Abreu-Silva, A.L., Carvalho, L.O.P, Cardoso, F.O., Dorval, M.E.M.C., Oshiro, E.T., Quaresma, P.F., Gontijo, C.M.F., Pacheco, R.S., Rossi, M.I.D., da Costa, S.C.G., Zaverucha do Valle, T. (2018) *Leishmania amazonensis* isolated from human visceral leishmaniasis: histopathological analysis and parasitological burden in diferente inbred mice. *Histol Histopathol.* 33:705.

Dias, E.S., Regina-Silva, S., França-Silva, J.C., Paz, G.F., Michalsky, E.M., Araújo, S.C., Valadão, J.L., de Oliveira Lara-Silva, F., de Oliveira, F.S., Pacheco, R.S., Fortes-Dias, C.L. (2011) Eco-epidemiology of visceral leishmaniasis in the urban area of Paracatu, state of Minas Gerais, Brazil. *Vet Parasitol.*176: 101.

Dorlo, T., P., Balasegaram, M., Beijnen, J.H., de Vries, P.J. (2012) Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *Antimicrob Chemother.* 11:2576.

Dyer, L. A. & Palmer, A. D. N. (2004) *Piper*: a model genus for studies of evolution, chemical ecology, and trophic interactions. New York: Kluwer Academic. 15:36.

Ee, G.C., Lim, C.M., Lim, C.K., Rahmani, M., Shaari, K., Bong, C. F. (2009) Alkaloids from *Piper sarmentosum* and *Piper nigrum*. *Nat Prod Res.* 23:1416.

Evans, T.G., Thai, L., Granger, D.L., Hibbs, J.B. Jr. (1993) Effect of *in vivo* inhibition of nitric oxide production in murine leishmaniasis. *J Immunol.* 151:907.

Fernandes, P.D., Zardo, R.S., Figueiredo, G.S.M., Silva, B.V., Pinto, A.C. (2014) Anti-inflammatory properties of convolutamydine A and two structural analogues. *Life Sci.* 116:16.

Fernandez, O.L., Diaz-Toro, Y., Ovalle, C., Valderrama, L., Muvdi, S., Rodriguez, I., Gomez, M.A., Saravia, N.G. (2014) Miltefosine and antimonial drug susceptibility of *Leishmania/Viannia* species and populations in regions of high transmission in Colombia. *PLoS. Negl. Trop. Dis.* 8:e2871.

Ferreira, C., Soares, D. C., Barreto-Junior, C. B., Nascimento, M. T., Freire-De-Lima, L., Delorenzi, J. C., Lima, M. E., Atella, G. C., Folly, E., Carvalho, T. M., Saraiva, E. M., Pinto-Da-Silva, L. H. (2011) Leishmanicidal effects of piperine, its derivatives, and analogues on *Leishmania amazonensis*. *Phytochemistry.* 72: 2155.

- Ferreira, C., Passos, C.L.A., Soares, D.C., Costa, K.P., Rezende, M.J.C., Lobão, A.Q. Pinto, A.C., Hamerski, L., Saraiva, E.M. (2017) Leishmanicidal activity of the alkaloid-rich fraction from *Guatteria latifolia*. *Exp Parasitol.* 172:51.
- Flores, N., Jiménez, I.A., Giménez, A., Ruiz, G., Gutiérrez, D., Bourdy, G., Bazzocchi, I.L. (2009) Antiparasitic activity of prenylated benzoic acid derivatives from *Piper* species. *Phytochemistry.*70:621.
- Fonseca-Silva, F., Inacio, J.D.F., Canto-Cavalheiro, M.M., Almeida-Amaral, E.E. (2011) Reactive Oxygen Species Production and Mitochondrial Dysfunction Contribute to Quercetin Induced Death in *Leishmania amazonensis*. *Plos One.* 6: 14666.
- Funari, C.S., Almeida, L., Passalacqua, T.G., Martinez, I., Ambrósio, D.L., Cicarelli, R.M.B., Silva, D.H.S., Graminha, M.A.S. (2016) Oleanonic acid from *Lippia lupulina* (Verbenaceae) shows strong in vitro antileishmanial and antitrypanosomal activity. *Acta Amaz.* 46:411.
- Gabriel, D., Pontes, L.B., Da Silva, J.S., Sudo, R.T., Correa, M.B., Pinto, A.C., Garden, S.J., Zapata-Sudo, G. (2011) Pharmacological activity of novel 2- hydroxyacetophenone isatin derivatives on cardiac and vascular smooth muscles in rats. *J Cardiovasc Pharmacol.* 57:20.
- Garcia, F.P., Lazarin-Bidóia, D., Ueda-Nakamura, T., Silva, S.de, O., Nakamura, C.V. (2013) Eupomatenoid-5 Isolated from Leaves of *Piper regnellii* Induces Apoptosis in *Leishmania amazonensis*. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013:940531.
- Ghorbani, M. & Farhoudi R. (2017) Leishmaniasis in humans: drug or vaccine therapy? *Drug Des Devel Ther.* 12:25.
- Goto, H. & Lauletta Lindoso, J.A. (2012) Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Infect Dis Clin North Am.* 26:293.
- Green, S.J., Meltzer, M.S.; Hibbs, J.B. Nacy, C.A. (1990) Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine-dependent killing mechanism. *J.Immunol.* 144: 278.
- Green, S.J., Scheller, L.F., Marletta, M.A., Seguin, M.C., Klotz, F.W., Slayter, M., Nelson, B.J., Nacy, C.A. (1994) Nitric oxide: cytokine-regulation of nitric oxide in host resistance to intracellular pathogens. *Immunol Lett.* 43:87.
- Grisard, E.C., Steinde, I.M., Shaw, J.J., Ishikawa, E.A., Carvalho-Pinto, C.J., Eger-Mangrich, I, Toma, H.K., Lima, J.H., Romanha, A.J., Campbell, D.A. (2000) Characterization of *Leishmania sp.* strains isolated from autochthonous cases of human cutaneous leishmaniasis in Santa Catarina State, southern Brazil. *Acta Trop.* 74:89.
- Guimarães, E.T., Lima, M.S., Santos, L.A., Ribeiro, I.M., Tomassini, T.B., Ribeiro dos Santos, R., dos Santos, W.L., Soares, M.B. (2009) Activity of physalins purified from *Physalis angulata* in in vitro and in vivo models of cutaneous leishmaniasis. *J. Antimicrob. Chemother.* 64:84.

- Gupta, N., Goyal, N., Rastogi, A.k. (2001) *In vitro* cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*. Trends in Parasitology. v.17, n. 3, p. 150.
- Gupta, G., Oghumu, S., Satoskar, A. R. (2013) Mechanisms of Immune Evasion in Leishmaniasis. Adv Appl Microbiol. 8:2155.
- Handler, M.Z., Patel, P.A., Kapila, R., Al-Qubati Y., Schwartz, R.A. (2015) Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. J Am Acad Dermatol. 6:911.
- Handman, E. (2000) Cell biology of *Leishmania*. Adv Parasitol. 44:1.
- Hashiguchi, Y., Gomez, E.L., Kato, H., Martini, L.R., Velez, L.N., Uezato H. (2016) Diffuse and disseminated cutaneous leishmaniasis: clinical cases experienced in Ecuador and a brief review. Tropical Medicine and Health.44:2.
- Henard, C.A., Carlsen, E.D., Hay, C., Kima, P.E., Soong, L. ( 2014) *Leishmania amazonensis* amastigotes highly express a trypanothione peroxidase isoform that increases parasite resistance to macrophage antimicrobial defenses and fosters parasite virulence. Plos Negl Trop Dis.8:3000.
- Henriques, C., Atella, G.C., Bonilha, V.L., de Souza, W (2003) Biochemical analysis of proteins and lipids found in parasitophorous vacuoles containing *Leishmania amazonensis*. Parasitol Res. 89: 123.
- Hobbs, J.J. & King. (1960) The Chemistry of Extractives form Hardwoods. Eusiderin, a possible by-product of Lignin Synthesis in Eusideroxylon zwagery. J. Chem. Soc. 4732-4738.
- Horikawa, M.M. & Peña M. S. (2011) Apoptose e mimetismo apoptótico em *Leishmania*: estratégias para uma infecção bem sucedida. Revista da Biologia 6: 32.
- Islamuddin, M. Chouhan, G., Farooque, A., Dwarakanath, B.S., Sahal, D., Afrin, F. (2015) Th1-biased immunomodulation and therapeutic potential of *Artemisia annua* in murine visceral leishmaniasis. PLoS Negl Trop Dis. v. 9, n. 1, p. e3321.
- Iwu, M.M., Jackson, J.E e Schuster, B.G. (1994) Medicinal plants in the fight against Leishmaniasis. Parasitol.Today, 10:65.
- Jain, K. & Jain, N.K. (2013) Novel therapeutic strategies for treatment of visceral leishmaniasis. Drug. Discov. Today. 18:1272.
- Jain, M.V., Paczulla, A.M., Klonisch, T., Dimgba, F.N., Rao, S.B., Roberg, K., Schweizer, F., Lengerke, C., Davoodpour, P., Palicharla, V.R., Maddika, S., Los, M. (2013) Interconnections between apoptotic, autophagic and necrotic pathways: implications for cancer therapy development. J Cell Mol Med. 1:12.

- Jaramillo, M. A. & Manos, P. S. (2001) Phylogeny and patterns of floral diversity in the genus *Piper* (Piperaceae). *American Journal of Botany*, v. 88, n. 4, p. 706.
- Jarrahpour, A., Khalili, D., De Clercq, E., Salmi, C. Brunel, J.M. (2007) Synthesis, antibacterial, antifungal and antiviral activity evaluation of some new bis-Schiff bases of isatin and their derivatives, *Molecules*. 12:1720.
- Ji, J., Sun, J., Qi, H., Soong, L. (2002) Analysis of T helper cell responses during infection with *Leishmania amazonensis*. *Am J Trop Med Hyg*. 66:338.
- Ji, J.; Sun, J. & Soong, L. (2003) Impaired expression of inflammatory cytokines and chemokines at early stages of infection with *Leishmania amazonensis*. *Infect.Immun*. 8: 4278.
- Johann, S., Cota, B.B., Souza-Fagundes, E.M., Pizzolatti, M.G., Resende, M.A., Zani, C.L. (2009) Antifungal activities of compounds isolated from *Piper abutiloides* Kunth. *Mycoses*. 52:499.
- Johann, S., Cisalpino, P.S., Watanabe, G.A., Cota, B.B., de Siqueira, E.P., Pizzolatti, M.G., Zani, C.L., de Resende, M.A. (2010) Antifungal activity of extracts of some plants used in Brazilian traditional medicine against the pathogenic fungus *Paracoccidioides brasiliensis*. *Pharm Biol*. 48:388.
- Jones, D. E., Buxbaum, L. U. & Scott, P. (2000) IL-4- independent inhibition of IL-12 responsiveness during *Leishmania amazonensis* infection., *J. Immunol*. 165: 364.
- Jones, D. E., Ackermann, M., Wille, U., Hunter, C. A. e Scott, P. (2002) Early enhanced Th1 response after *Leishmania amazonensis* infection of C57BL/6 interleukin-10 deficient mice does not lead to resolution of infection. *Infect Immun*. 70:2151.
- Kang, Y.J., Park, H.J., Chung, H.J., Min, H.J., Park, E.J., Lee, M.A., Shin, Y., Lee, S.K. (2012) Wnt/-catenin signaling mediates the antitumor activity of magnolol in colorectal cancer cells. *Mol. Pharmacol*. 82:168.
- Karali, N., Gürsoy, A., Kandemirli, F., Shvets, N., Kaynak, F.B., Özbey, S., Kovalishyn, V., Dimoglo, A. (2007) Synthesis and structure-antituberculosis activity relationship of 1H-indole-2,3-dione derivatives, *Bioorganic Med. Chem*. 15:5888.
- Kato, M. J. & Furlan, M. Chemistry and evolution of the Piperaceae. (2007) *Pure and Applied Chemistry*. v. 79, n. 4, p. 529.
- Khan, K. M., Mughal, U.R., Samreen, Perveen, S., Choudhary, M. I. (2008) Schiff Bases of Isatin: Potential Anti-Leishmanial Agents. *Letters in Drug Design & Discovery*. 5: 243.
- Khan, F. A. K., Zaheer, Z., Sangshetti, J. N., Patil, R. H., Farooqui, M. (2017) Antileishmanial evaluation of clubbed bis(indolyl)-pyridine derivatives: one-pot synthesis, in vitro biological evaluations and in silico ADME prediction. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*. 27: 567.

Khouri, R., Bafica, A., Silva, M.da. P., Noronha, A., Kolb, J.P., Wietzerbin, J., Barral, A., Barral-Netto, M., Van Weyenbergh, J. (2009) IFN-beta impairs superoxide-dependent parasite killing in human macrophages: evidence for a deleterious role of SOD1 in cutaneous leishmaniasis. *J Immunol.* 182:2525.

Korhonen, R. (2005) Nitric oxide production and signaling in inflammation. *Current drug targets. Inflammation and allergy, San Francisco*, v. 4, n. 4, p. 471.

Kumar, R., Chauhan, S.B., Ng, S.S., Sundar, S., Engwerda, C.R. (2017) Immune Checkpoint Targets for Host-Directed Therapy to Prevent and Treat Leishmaniasis. *Front Immunol.* 8:1492.

Kunle, O.F., Egharevba, H.O., Ahmadu, P.O. (2012) Standardization of herbal medicines—a review. *International Journal of Biodiversity and Conservation.* 4:101.

Lago, J. H. G., Ramos, C. S., Casanova, D. C. C., Morandim, A. A., Bergamo, D. C. B., Cavalheiro, A. J., Bolzani, V. S., Furlan, M., Guimarães, E. F., Young, M. C. M., Kato, M. J. (2004) Benzoic acid derivatives from *Piper* species and their fungitoxic activity against *Cladosporium cladosporioides* and *C. sphaerospermum*. *Journal of Natural Products.* v. 67, n. 11, p. 1783.

Lainson R. & Shaw, J.J. (1978) Epidemiology and ecology of leishmaniasis in Latin-America. *Nature.* 5664:595.

Lakhal-Naouar, I., Slike, B.M., Aronson, N.E., Marovich, M.A. (2015 ).The Immunology of a Healing Response in Cutaneous Leishmaniasis Treated with Localized Heat or Systemic Antimonial Therapy. *PLoS Negl Trop Dis.* 9:e0004178.

Lee, W.S., Baek, Y.I., Kim, J.R., Cho, K.H., Sok, D.E., Jeong, T.S. (2004) Antioxidant activities of a new lignan and a neolignan from *Saururus chinensis*. *Bioorg Med Chem Lett.* 14:5623.

Lee, S.J., Zhang, J., Choi, A.M., Kim, H.P. (2013) Mitochondrial dysfunction induces formation of lipid droplets as a generalized response to stress. *Oxid Med Cell Longev.* 2013:327167.

Leon-Diaz, R., Meckes-Fischer, M., Valdovinos-Martinez, L., Hernandez-Pando, H.R.E., Campos, M.G., Jimenez-Arellanes, M.A. (2013) Antitubercular activity and subacute toxicity of (–)-licarin A in BALB/c mice: a neolignan isolated from *Aristolochia taliscana*. *Arch Med Res.* 44: 99.

Lessa, M.M., Lessa, H. A., Castro, T.W.N, Oliveira, A., Scherifer, A., Machado, P., Carvalho, E.M. (2007) Leishmaniose mucosa: aspectos clínicos e epidemiológicos. *Rev Bras Otorrinolaringologia.* 73: 843.

Lima, G.S., Castro-Pinto, D.B., Machado, G.C., Maciel, M.A., Echevarria, A. (2015) Antileishmanial activity and trypanothione reductase effects of terpenes from the Amazonian species *Croton cajucara* Benth (Euphorbiaceae). *Phytomedicine.* 22:1133.

- Lindoso, J.A., Costa, J.M., Queiroz, I.T., Goto, H. (2012) Review of the current treatments for leishmaniasis. *Res. Rep. Trop. Med.* 3:69.
- Liese, J., Schleicher, U., Bogdan, C. (2008) The innate immune response against *Leishmania* parasites. *Immunobiology.* 213:377.
- Liu, D. & Uzonna, J. E. (2012) The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, Switzerland,* 2:83.
- Loke, P., Nair, M. G., Parkinson, J., Guiliano, D., Blaxter, M., Allen, J. E. (2002). IL-4 dependent alternatively-activated macrophages have a distinctive *in vivo* gene expression phenotype. *BMC Immunol.* 3:7.
- Maroñas, P.A., Sudo, R.T., Corrêa, M.B., Pinto, A.C., Garden, S.J., Trachez, M.M., Zapata-Sudo, G. (2008) Vasodilatory activity of novel carbamate derivatives of isatin, *Clin Exp Pharmacol and Physiol.* 35:1091.
- Martins, R. C. C., Lago, J. H. G., Albuquerque, S., Kato, M. J. (2003) Trypanocidal tetrahydrofuran lignans from inflorescences of *Piper solmsianum*. *Phytochemistry.* v. 64, n. 2, p. 667.
- Matheus, M.E., Violante, F. A., Garden, S.J., Pinto, A.C., Fernandes, P.D. (2007) Isatins inhibit cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase in a mouse macrophage cell line. *European Journal of Pharmacology.* 556:200.
- McGwire, B.S. & Satoskar, A.R. (2014) Leishmaniasis: clinical syndromes and treatment. *QJM.* 107:7.
- Mendes Wanderley, J. L., Costa, J. F., Borges, V. M., Barcinski, M. (2012) Subversion of Immunity by *Leishmania amazonensis* Parasites: Possible Role of Phosphatidylserine as a Main Regulator. *J Parasitol Res.* 2012: 981686.
- Misra, P., Kumar, A., Khare, P., Gupta, S., Kumar, N., Dube, A. (2009) Pro-apoptotic effect of the landrace Bangla Mahoba of *Piper betle* on *Leishmania donovani* may be due to the high content of eugenol. *J Med Microbiol.* 58:1058.
- Modolell, M., Corraliza, I. M., Link, F., Soler, G., Eichmann, K. (1995) Reciprocal regulation of the nitric oxide synthase/arginase balance in mouse bone marrow derived macrophages by TH1 and TH2 cytokines. *Eur J Immunol.* 25: 1101.
- Mohapatra, S. (2014) Drug resistance in leishmaniasis: Newer developments. *Trop Parasitol. Review.* 4:4.
- Monge-Maillo, B.; López-Vélez, R. (2013) Therapeutic options for Old World cutaneous Leishmaniasis and New World Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. *Drugs.* 73:1889.

- Muhaimin, Syamsurizal, Latief, M., Anggraini, S., Didin Mujahidin (2017) Synthesis of Acetyl Propylen Ester Eusiderin A and its activity againts *Tricophyton mentagrophytes*. 141: 0975.
- Mukbel, R.M., Patten, C. Jr., Gibson, K., Ghosh, M., Petersen, C., Jones, D.E. (2007) Macrophage killing of *Leishmania amazonensis* amastigotes requires both nitric oxide and superoxide. Am J Trop Med Hyg. 76:669.
- Murback, N.D., Hans Filho, G., Nascimento, R.A., Nakazato, K.R., Dorval, M.E. (2011) American cutaneous leishmaniasis: clinical, epidemiological and laboratory studies conducted at a university teaching hospital in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. An Bras Dermatol. 1:55.
- Murray, H. W., Berman, J. D., Davies C. R, Saravia N.G. (2005) Advances in leishmaniasis. Lancet. 4:1561.
- Muzitano, M.F., Cruz, E.A., de Almeida, A.P., Da Silva, S.A., Kaiser, C.R., Guette, C., Rossi-Bergmann, B., Costa, S.S., (2006). Quercitrin: an antileishmanial flavonoid glycoside from *Kalanchoe pinnata*. Planta Med. 72:81.
- Nakamura, C. V., Santos, A. O., Vendrametto, M. C., Luize, P. S., Dias Filho, B. P., Cortez, D.A.G., Ueda-Nakamura, T. (2006) Atividade antileishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C. DC. var. *pallescens* (C. DC.) Yunck. Revista Brasileira de Farmacognosia. 16:61.
- Naumov, P. & Anastasova, F. (2001) Experimental and theoretical vibrational study of isatin, its 5-(NO<sub>2</sub>, F, Cl, Br, I, CH<sub>3</sub>) analogues and the isatinato anion, Spectrochim. Acta - Part A Mol. Biomol. Spectrosc. 57:469.
- Naz, T., Mosaddik, A., Rahman, M., Muhammad, I., Haque, E., Cho, S.K. (2012) Antimicrobial, antileishmanial and cytotoxic compounds from *Piper chaba*. Nat Prod Res. 26:979.
- 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. (2013) Neolignan Licarin A presents effect against *Leishmania (Leishmania) major* associated with immunomodulation *in vitro*. Exp. Parasitol. 135: 307.
- Nisha, G., J., Rosenthal, P.J., Kumar, V. (2014)  $\beta$ -amino-alcohol tethered 4-aminoquinoline-isatin conjugates: Synthesis and antimalarial evaluation. Eur J Med Chem. 84:566.
- Norsworthy, N. B., Sun, J., Elnaiem, D., Lanzaro, G., Soong, L. (2004) Sand fly saliva enhances *Leishmania amazonensis* infection by modulating interleukin-10 production. Infect Immun. 72: 1240.

- Nozais, J.P. (2003) The origin and dispersion of human parasitic diseases in the old world (Africa, Europe and Madagascar). *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 98:13.
- Nylén S. & Eidsmo L. (2012) Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. *Parasite Immunol.* 12:551.
- Okwor, I. & Uzonna J. (2016) Social and Economic Burden of Human Leishmaniasis. *Am J Trop Med Hyg.* 3:489.
- Oliveira, W.N., Ribeiro, L.E., Schrieffer, A., Machado, P., Carvalho, E.M., Bacellar, O. (2014) The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. *Cytokine.* 66:127.
- Oliveira, L.F.G., Pereira, B.A.S., Gilbert, B., Corrêa, A.L., Rocha, L., Alves, C.R., (2016). Natural products and phytotherapy: an innovative perspective in leishmaniasis treatment. *Phytochem. Rev.* 2:219.
- Oryan A. (2015) Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. *Iran J Vet Res. Winter.* 16:1.
- Ouellette, M., Drummelsmith, J., Papadopoulou, B. (2004) Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments. *Drug Resist Updat.* 7: 257.
- Pakravan, P., Kashanian, S., Khodaei, M.M., Harding, F.J. (2013) Biochemical and pharmacological characterization of isatin and its derivatives: from structure to activity. *Pharmacol Rep.* 65:31.
- Pandey, K., Sinha, P.K., Das, V.R., Bimal. S., Singh, S.K., Das P. (2009) Pharmacotherapeutic options for visceral leishmaniasis-current scenario. *Clin Med Pathol.* 23:1.
- Pandeya, S.N., Smitha, S., Jyoti, M., Sridhar, S.K. (2005) Biological activities of isatin and its derivatives. *Acta Pharm.* 55:27.
- Pandeya, S.N., Sriram, D., Nath, G., De Clercq, E. (1999) Synthesis and antimicrobial activity of Schiff and Mannich bases of isatin and its derivatives with pyrimidine. *Farmaco.* 54:624.
- Paris, C., Loiseau, P.M., Bories, C., Bréard, J. (2004) Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:852.
- Parmar, V.S., Jain, S.C., Bisht, K.S., Jain, R., Taneja, P., Jha, A., Tyagi, O.D., Prasad, A.K., Wengel, J., Olsen, C.E., Boll, P.M. (1997) Phytochemistry of the genus *Piper*. *Phytochemistry.* 46:597.
- Passos, C. L. A., Ferreira, C., Soares, D. C., Saraiva, E. M. (2015). Leishmanicidal Effect of Synthetic *trans*-Resveratrol Analogs. Delmas D, ed. *Plos One.* 10: 0141778.

- Passos, C.L.A., Rodríguez, R., Ferreira, C., Soares, D.C., Somner, G.V., Hamerski, L., Pinto, A.C., Rezende, C.M., Saraiva, E.M. (2017) Anti-*Leishmania amazonensis* activity of *Serjania lethalis* A. St.-Hil. Parasitol. Int. 66: 940.
- Pelizzaro-Rocha, K.J., Veiga-Santos, P., Lazarin-Bidóia, D., Ueda-Nakamura, T., Dias Filho, B.P., Ximenes, V.F., Silva, S.O., Nakamura, C.V. (2011) Trypanocidal action of eupomatenoid-5 is related to mitochondrion dysfunction and oxidative damage in *Trypanosoma cruzi*. Microbes Infect. 13:1018.
- Pereira, B.A. & Alves, C.R. (2008) Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Vet. Parasitol. 158:239.
- Pervez, H., Manzoor, N., Yaqub, M., Khan, K.M. (2014) 5-Nitroisatin-derived thiosemicarbazones: potential antileishmanial agents. J Enzyme Inhib Med Chem. 29:628.
- Pintado, V. & López-Vélez R. (2001) HIV-associated visceral leishmaniasis. Clin. Microbiol Infect. 6:291.
- Pinto-Martinez, A.K., Rodriguez-Durán, J., Serrano-Martin, X., Hernandez-Rodriguez, V., Benaim, G. (2018) Mechanism of Action of Miltefosine on *Leishmania donovani* Involves the Impairment of Acidocalcisome Function and the Activation of the Sphingosine-Dependent Plasma Membrane Ca<sup>2+</sup> Channel Antimicrobial Agents and Chemotherapy. 62:e01614.
- Ponte-Sucre, A., Gamarro, F., Dujardin, J.C., Barrett, M.P., López-Vélez, R., García-Hernández, R., Pountain, A.W., Mwenechanya, R., Papadopoulos, B. (2017) Drug resistance and treatment failure in leishmaniasis: A 21st century challenge. PLoS Negl Trop Dis. 11: e0006052.
- Prajapati, V.K., Awasthi, K., Gautam, S., Yadav, T.P., Rai, M., Srivastava, O.N., Sundar, S. (2011) Targeted killing of *Leishmania donovani* *in vivo* and *in vitro* with amphotericin B attached to functionalized carbon nanotubes. J. Antimicrob. Chemother. 66:874.
- Prakash, C.R. & Raja, S. (2013) Synthesis, characterization and *in vitro* antimicrobial activity of some novel 5-substituted Schiff and Mannich base of isatin derivatives, J. Saudi Chem. Soc. 17: 337.
- Proto, W.R., Coombs, G.H., Mottram, J.C. (2013) Cell death in parasitic protozoa: regulated or incidental? Nat Rev Microbiol. 11:58.
- Raj, A.A., Raghunathan, R. Sridevikumari, M.R., Raman, N. (2003) Synthesis, antifungal and antimicrobial activity of a new class of spiro pyrrolidines. Bioorg Med Chem.11:407.
- Raj, R.; Biot, C.; Carrere-Kremer, S.; Kremer, L.; Guèrardel, Y.; GUT, J.; Rosenthal, P.J.; Forge, D.; Kumar, V. (2014) 7-Chloroquinoline-isatin conjugates: antimalarial, antitubercular, and cytotoxic evaluation. Chem Biol Drug Des. 83: 622.
- Rajasekaran, R. & Chen, Y.P. (2015) Potential therapeutic targets and the role of technology in developing novel antileishmanial drugs. Drug Discov Today. 20:958.

- Rates, S. M. (2001) Plants as source of drugs. *Toxicon*. 39: 603.
- Reguera, R.M.; Balaña-Fouce, R.; Showalter, M.; Hickerson, S.; Beverley, S.M. (2009) *Leishmania major* lacking arginase (ARG) are auxotrophic for polyamines but retain infectivity to susceptible BALB/c mice. *Mol. Biochem. Parasitol*. 165:48.
- Roberts, L. J., Handman, E., Foote, S.J. (2001) Science, medicine, and the future leishmaniasis. *BMJ*. 321: 801.
- Roberts, S.C., Tancer, M.J., Polinsky, M.R., Gibson, K.M., Heby, O., Ullman, B. (2004) Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in *Leishmania*. Characterization of gene deletion mutants. *J Biol Chem*. 279:23668.
- Roberts, M. T. (2006) Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. *Br Med Bull*. 75: 115.
- Rocha, L.G., Almeida, J.R.G.S., Macêdo, R.O., Barbosa-Filho, J.M. (2005) A review of natural products with antileishmanial activity. *Phytomed*. 12: 514.
- Rodrigues, V., Cordeiro-da-Silva, A., Laforge, M., Silvestre, R., Estaquier, J. (2016) Regulation of immunity during visceral *Leishmania* infection. *Parasit & Vectors*. 9: 118.
- Rodríguez, N.E. & Wilson, M.E. (2014) Eosinophils and mast cells in leishmaniasis. *Immunol Res*. 59:129.
- Rogers, M.; Kropf, P.; Choi, B.S.; Dillon, R.; Podinovskaia, M.; Bates, P.; Müller, I. (2009) Proteophosphoglycans regurgitated by *Leishmania*-infected sand flies target the L-arginine metabolism of host macrophages to promote parasite survival. *PLoS Pathog*. 5:e1000555.
- Roma, E.H., Macedo, J.P., Goes, G.R., Gonçalves, J.L., Castro, W.d., Cisalpino, D., Vieira, L.Q. (2016) Impact of reactive oxygen species (ROS) on the control of parasite loads and inflammation in *Leishmania amazonensis* infection. *Parasit Vectors*. 9:193.
- Romão, P. R., Dias, R. O., Cruz, K. K., Marques, F. C. S., Monteiro, M. C. (2007) Leishmaniose: resposta imune e mecanismos antioxidantes de escape. *Revista de Pesquisa e Extensão em Saúde*. v. 3, n. 1, p. 1.
- Ruiz, C., Haddad, M., Alban, J., Bourdy, G., Reatgui, R., Castillo, D., Sauvain, M., Deharo, E., Estevez, Y., Arevalo, J., Rojas, R. (2011) Activity-guided isolation of antileishmanial compounds from *Piper hispidum*. *Phytochem. Lett*. 4:363.
- Ryu, J.H., Son, H.J., Lee, S.H., Sohn, D.H. (2002) Two neolignans from *Perilla frutescens* and their inhibition of nitric oxide synthase and tumor necrosis factor- $\alpha$  expression in murine macrophage cell line RAW 264.7. *Bioorg Med Chem Lett*. 12:649.
- Sabet, R., Mohammadpour, M., Sadeghi, A., Fassihi, A. (2010) QSAR study of isatin analogues as in vitro anti-cancer agents, *Eur. J. Med. Chem*. 45: 1113.

- Sacks, D. & Anderson, C. (2004) Re-examination of the immunosuppressive mechanisms mediating non-cure of *Leishmania* infection in mice. *Immunol. Rev.* 201: 225.
- Sacks, D. & Kamhawi, S. (2001) Molecular aspects of parasites-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu. Rev. Microbiol.* 55: 453.
- Sánchez-Cañete, M.P., Carvalho, L., Perez-Victoria, F.J., Gamarro, F., Castanys, S., (2009). Low plasma membrane expression of the miltefosine transport complex renders *Leishmania braziliensis* refractory to the drug. *Antimicrob. Agents Chemother.* 53: 1305.
- Santos, P.R.D., Moreira, D.L., Guimaraes, E.F., Kaplan, M.A.C. (2001) Essential Oil Analysis of 10 Piperaceae species from the Brazilian Atlantic Forest. *Phytochemistry.* 58:547.
- Sareen, K., Kohli, M.K.P., Gujral, M.L. (1962) Anticonvulsant drugs based on the neurochemistry of seizures. *Indian J Physiol Pharmacol.* 6:87.
- Sauvain, M., Kunesch, N., Poisson, J., Gantier, J.C., Gayral, P., Dedet, J.P. (1996) Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from the Amazonian liana *Dolichocarpus dentatus* (dilleniaceae). *Phytotherapy Research - Phytother Res.* 10: 1.
- Schlein, Y., Jacobson, R. L.; Messer, G. (1992) *Leishmania* infections damage the feeding mechanism of the sand fly vector and impede parasite transmission by bite. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 89: 9944.
- Scott, P. & Novais, F. O. (2016) Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. *Nature Reviews Immunology* 16: 581.
- Sen, R.E. & Chatterjee, M. (2011) Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. *Phytomedicine.* 18: 1056.
- Shaha, C. (2006). Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. *Indian J Med Res.* 233:244.
- Silva, B. V. (2013) Isatin, a versatile molecule: studies in Brazil. *Journal of the Brazilian Chemical Society.* 24:707.
- Silveira, F.T., Lainson, R., Corbett, C.E. (2004) Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 99: 239.
- Singh, N.; Kumar, M.; Singh, R. K. (2012) Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian Pacific journal of tropical medicine*, v. 5, n. 6, p. 485.
- Soares, D.C., Pereira, C.G., Meireles, M.A., Saraiva, E.M. (2007) Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*. *Parasitol Int.* 56:135.

- Sriram, D., Yogeewari, P., Basha, J.S., Radha, D.R., Nagaraja, V. (2005) Synthesis and antimycobacterial evaluation of various 7-substituted ciprofloxacin derivatives. *Bioorg Med Chem.* 13:5774.
- Stenger, S., Thüning, H., Röllinghoff, M., Bogdan, C. (1994) Tissue expression of inducible nitric oxide synthase is closely associated with resistance to *Leishmania major*. *J Exp Med.* 180:783.
- Steverding D. (2017) The history of leishmaniasis. *Parasit Vectors.*10:82.
- Sundar, S., Jha, T.K., Thakur, C.P., Engel, J., Sindermann, H., Fischer, C., Junge, K., Bryceson, A., Berman, J. (2002) Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N Engl J Med.* 347:1739.
- Sundar, S., Chakravarty, J., Rai, V.K., Agrawal, N., Singh, S.P., Chauhan, V., Murray, H.W. (2007) Amphotericin B treatment for Indian visceral leishmaniasis: response to 15 daily versus alternate-day infusions. *Clin Infect Dis.* 45:556.
- Sundar, S., Singh, A., Rai, M., Prajapati, V.K., Singh, A.K., Ostyn, B., Boelaert, M., Dujardin, J.C., Chakravarty, J. (2012) Efficacy of miltefosine in the treatment of visceral leishmaniasis in India after a decade of use. *Clin Infect Dis.* 4:543.
- Sundar S. & Chakravarty J. (2015) An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. *Expert Opin Pharmacother.* 16:237.
- Suzuki, A., Shirota, O., Mori, K., Sekita, S., Fuchino, H., Takano, A., Kuroyanagi, M. (2009) Leishmanicidal active constituents from Nepalese medicinal plant Tulsi (*Ocimum sanctum L.*). *Chem Pharm Bull (Tokyo).* 57:245.
- Syafii, W., Samejima, M., Yohimoto T. (1987) The role of Extractives in Decay Resistance of Ulin Wood (*Eusideroxylon zwageri*, T.et .B). *Bull. Tokyo. Univ. For.* 77:1.
- Syamsurizal & Afrida. (2012) Synthesis and Structure Activity Relationships of Eusiderin A Derivatives as Antifeedant. *Journal of Chemistry and Materials Research.* 2:64.
- Syamsurizal & Afrida. (2014) Modification of Allylic Moiety of Eusiderin A to Enhance the Antifeedant Potency. *Journal of Natural Sciences Research.*6: 2225.
- Teixeira, M.J., Teixeira, C.R., Andrade, B.B., Barral-Netto, M., Barral, A. (2006) Chemokines in host-parasite interactions in leishmaniasis. *Trends Parasitol.* 1:32.
- Tempone, A.G., Sartorelli, P., Teixeira, D., Prado, F.O., Calixto, I.A., Lorenzi, H., Melhem, M.S. (2008) Brazilian flora extracts as source of novel antileishmanial and antifungal compounds. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 103:443.
- Thevissen, K., Terras, F.R., Broekaert, W.F. (1999) Permeabilization of fungal membranes by plant defensins inhibits fungal growth. *Appl Environ Microbiol.* 65:5451.

- Tiuman, T. S., Ueda-Nakamura, T., Garcia Cortez, D. A., Dias Filho, B. P., Morgado-Díaz, J. A., de Souza, W., & Nakamura, C. V. (2005) Antileishmanial Activity of Parthenolide, a Sesquiterpene Lactone Isolated from *Tanacetum parthenium*. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. 49:176.
- Tiuman, T.S., Santos, A.O., Ueda-Nakamura, T., Filho, B.P., Nakamura, C.V. (2011) Recent advances in leishmaniasis treatment. *Int J Infect Dis*. 15:525.
- Tripathi, P., Singh, V., Naik, S. (2007) Immune response to leishmania: paradox rather than paradigm. *FEMS Immunol Med Microbiol*. 51:229.
- Vakil, N.H., Fujinami, N., Shah, P. J. (2015) Pharmacotherapy for leishmaniasis in the United States: focus on miltefosine. *Pharmacotherapy*. 35:536.
- Van Assche T, Deschacht M, da Luz RA, Maes L, Cos P. (2011) *Leishmania*-macrophage interactions: insights into the redox biology. *Free Radic Biol Med*. 51:337.
- Varela, M.T., Dias, R.Z., Martins, L.F., Ferreira, D.D., Tempone ,A.G., Ueno, A.K., Lago, J.H., Fernandes, J.P. (2016) Gibbilimbol analogues as antiparasitic agents--Synthesis and biological activity against *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania (L.) infantum*. *Bioorg Med Chem Lett*. 26:1180.
- Vendrametto, M.C., Santos, A.O., Nakamura, C.V., Dias Filho, B.P., Cortez, D.A.G., Ueda-Nakamura, T. (2010) Evaluation of antileishmanial activity of eupomatenoid-5, a compound isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallescens*. *Parasitol. Int*. 59:154.
- Vine, K.L., Locke, J., Ranson, M.M., Benkendorff, K., Pyne, S.G., Bremner, J.B. (2007) In vitro cytotoxicity evaluation of some substituted isatin derivatives, *Bioorganic Med. Chem*. 15: 931.
- Vine, K. L., Matesic, L., Locke, J. M., Ranson, M., Skropeta, D. (2009) Cytotoxic and anticancer activities of Isatin and Its derivatives: a comprehensive review from 2000-2008. *Anticancer Agents Med Chem*. 9:397.
- Von Stebut, E. (2015) Leishmaniasis. *J Dtsch Dermatol Ges*. 3:191.
- Walker, D.M., Oghumu, S., Gupta, G., McGwire, B.S., Drew, M.E., Satoskar, A.R. (2014) Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. *Cell Mol Life Sci*. 71:1245.
- Wei, X., Charles, I. G., Smith, A., Ure, J., Feng, G., Huang, F., Xu, D. Mullers, W., Moncada, S., Liew, F. Y. (1995) Altered immune responses in mice lacking inducible nitric oxide synthase. *Nature*. 375: 408.
- Weingärtner, A., Kemmer, G., Müller, F.D., Zampieri, R.A., Gonzaga dos Santos, M., Schiller, J., Pomorski T.G. (2012) *Leishmania* Promastigotes Lack Phosphatidylserine but Bind Annexin V upon Permeabilization or Miltefosine Treatment. *Plos One* 7: e42070.

WHO. World Health Organization. <http://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis> . Acesso em 14 de Junho 2018.

WHO. World Health Organization. Disponível em: <http://apps.who.int/gho/data/node.main.NTDLEISH?lang=en> . Acesso em 14 de Junho 2018.

WHO. World Health Organization. Disponível em: [http://www.who.int/leishmaniasis/research/978\\_92\\_4\\_12\\_949\\_6\\_Annex6.pdf?ua=1](http://www.who.int/leishmaniasis/research/978_92_4_12_949_6_Annex6.pdf?ua=1). Acesso em 22 de Julho 2018.

Wiwanitkit V. (2012) Interest in paromomycin for the treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar). Therapeutics and Clinical Risk Management. 8:323.

Wright, C. W. & Phillipson, J. D. (1990) Natural Products and Development of Selective Antiprotozoal Drugs. Phytother. Res. 4: 127.

Yoneyama, K.A., Tanaka, A.K., Silveira, T.G., Takahashi, H.K., Straus, A.H. (2006) Characterization of *Leishmania (Viannia) braziliensis* membrane microdomains, and their role in macrophage infectivity. J Lipid Res 47: 2171.

Zhao, F., Chen, L., Bi, C., Zhang, M., Jiao, W., Yao, X. (2013) In vitro anti-inflammatory effect of picrasmanin A by the inhibition of iNOS and COX-2 expression in LPS-activated macrophage RAW 264.7 cells. Molecular Medicine Reports. 8: 1575.

Zhang, H.J., Tamez, P.A., Hoang, V.D., Ghee, T.T., Nguyen, V.H., Xuan, L.T., Huong, L.M., Cuong, N.M., Thao, D.T., Soejarto, D.D., Fong, H.H.S., Pezzuto, J.M.. (2001) Antimalarial compounds from *Rhapidophora decursiva*. J. Nat. Prod. 64:772.

Zhang K, Pompey J, Hsu F, Key P, Bandhuvula P, Saba, J.D., Turk, J., Beverley, S.M. (2007) Redirection of sphingolipid metabolism toward de novo synthesis of ethanolamine in *Leishmania*. EMBO. 26: 1094.

Zheng, L., Kind, R.T., Decuyper, S., Freyend, S.J.V., Coombs, G.H., Watson, D.G. (2010) Profiling of lipids in *Leishmania donovani* using hydrophilic interaction chromatography in combination with Fourier transform mass spectrometry. Rapid Commun Mass Spectrom. 24: 2074.