



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

BRUNA TACIANE DA SILVA BORTOLETI

**ATIVIDADE *in vitro* DO ÁCIDO GRANDIFLORÊNICO SOBRE
*Leishmania amazonensis***

Londrina
2017

BRUNA TACIANE DA SILVA BORTOLETI

**ATIVIDADE *in vitro* DO ÁCIDO GRANDIFLORÊNICO SOBRE
*Leishmania amazonensis***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli

Londrina
2017

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática do Sistema de Bibliotecas da UEL

Bortoleti, Bruna Taciane da Silva.

Atividade in vitro do ácido grandiflorênico sobre *Leishmania amazonensis* / Bruna Taciane da Silva Bortoleti. - Londrina, 2017.

74 f. : il.

Orientador: Wander Rogério Pavanelli.

Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, 2017.

Inclui bibliografia.

1. Leishmaniose - Tese. 2. Doenças transmissíveis - Tese. 3. Produtos naturais - Tese. 4. Diterpenos - Tese. I. Pavanelli, Wander Rogério. II. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde. III. Título.

BRUNA TACIANE DA SILVA BORTOLETI

**ATIVIDADE *in vitro* DO ÁCIDO GRANDIFLORÊNICO SOBRE
*Leishmania amazonensis***

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Londrina, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

BANCA EXAMINADORA (Titulares)

Orientador: Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Waldiceu Aparecido Verri Junior
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof. Dr. Nilton Syogo Arakawa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Ivete Conchon Costa
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Prof^a. Dr^a. Rubia Casagrande
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 20 de fevereiro de 2017.

AGRADECIMENTO

À Deus por me proporcionar a oportunidade de iniciar e concluir este trabalho.

À minha família, principalmente aos meus pais Alexandre e Cristiane e meus avós Vani, Amélia e Admir pelo esforço, paciência e amor que foram doados durante todas as dificuldades enfrentadas e por sempre me fazerem acreditar que eu sou capaz de alcançar meus objetivos.

Ao meu orientador Dr. Wander Rogério Pavanelli por ter me dado a oportunidade de ingressar no Laboratório de Parasitologia, onde pude aprender e crescer muito em minha carreira científica. Obrigada pela paciência, pelos ensinamentos e por toda dedicação doada para a realização deste trabalho.

À professora Dr^a. Ivete Conchon Costa, obrigada por ter me recebido tão bem no laboratório, pela constante doação de conhecimento sobre os parasitos e lições de amor pela profissão.

À professora Dr^a. Idessania Nazareth Costa, pelo carinho, companheirismo e por todo o conhecimento compartilhado com tanto amor.

À professora Ms. Francine Nesello Melanda, pela confiança, pela amizade e por não medir esforços em ajudar o próximo a crescer.

Aos amigos do laboratório Milena, Fernanda, Amanda, Manoela, João Paulo e Allan por toda ajuda durante os experimentos, por todo o conhecimento científico e por fazerem os meus dias mais divertidos e especiais.

Ao Professor Dr. Nilton S. Arakawa por gentilmente ceder o composto Ácido Grandiflorênico para a realização desses experimentos.

À todos os professores e funcionários do Departamento de Ciências Patológicas pelo suporte para a realização deste trabalho.

Agradeço à CAPES e CNPq pela bolsa concedida e financiamento do meu projeto.

À todos que diretamente ou indiretamente acreditaram neste trabalho e contribuíram para sua realização.

*“Peçam, e será dado; busquem, e encontrarão; batam, e a porta será aberta.
Pois todo o que pede recebe; o que busca encontra”
Mateus 7:7*

BORTOLETI, Bruna Taciane da Silva. **Atividade *in vitro* do ácido grandiflorênico sobre *Leishmania amazonensis***. 2017. 74 f. Dissertação (Mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

RESUMO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença de caráter zoonótico, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, que apresenta como principal característica a formação de lesões na pele e mucosas. A elevada toxicidade, os altos custos e a resistência de algumas cepas aos medicamentos atuais estimulam a busca por alternativas terapêuticas para esta infecção. As plantas são fontes ricas em compostos químicos, dentre eles os flavonoides, esteroides e diterpenos. Dentre as classes dos diterpenos, o constituinte majoritário presente nas folhas da *Sphagneticola trilobata* é o ácido grandiflorênico (AG), que apresenta atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e antinociceptiva. Em nosso estudo, foi investigada a ação do AG sobre formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis*. Podemos observar que em 24 h, apenas a concentração de 25 nM foi capaz de inibir a proliferação de promastigotas, e após 48 e 72 h, todas as concentrações (3.12, 6.25, 12.50 e 25 nM) tiveram efeito sobre o crescimento dos parasitos. Este fenômeno de redução da proliferação foi acompanhado de alterações morfológicas através de microscopia eletrônica de varredura (MEV), na qual o tratamento com AG 25 nM provocou danos à morfologia do parasito. Em seguida, investigamos quais mecanismos estariam envolvidos na morte do protozoário, sendo verificado aumento na produção de espécies reativas de oxigênio, exposição de fosfatidilserina e permeabilização da membrana plasmática do parasito, sugerindo um evento de “apoptose-like”. Sabendo que o AG tem ação sobre formas promastigotas livres, estudamos seu efeito sobre amastigotas intracelulares e macrófagos infectados com *L. amazonensis*, observamos que o tratamento provocou redução na porcentagem de células infectadas e no número de amastigotas por macrófago, sem apresentar citotoxicidade nos macrófagos peritoneais e eritrócitos humano. Verificamos a produção de citocinas, NO e espécies reativas de oxigênio (EROs) por macrófagos infectados, no entanto, o AG não provocou diferenças na secreção de IL-1 β , IL-12, IL-6 e TNF- α , nem na síntese de NO e EROs. Portanto o tratamento AG atua em formas promastigotas através do mecanismo “apoptose-like” e em formas amastigotas intracelulares agindo diretamente, independente da modulação de citocinas, síntese de NO e EROs neste modelo. Sendo assim, sugerindo que o AG é um potencial alternativa terapêutica no tratamento da leishmaniose, onde o atual tratamento é a base de drogas tóxicas e ineficazes.

Palavras-chave: Leishmaniose. Diterpene. Imunomodulação. Espécie reativa de oxigênio (EROs). “Apoptose-like”.

BORTOLETI, Bruna Taciane da Silva. *In vitro* activity of grandiflorenic acid on *Leishmania amazonensis*. 2017. 74 p. Dissertation (Master's Degree in Health Sciences) – Universidade Estadual de Londrina, Londrina, 2017.

ABSTRACT

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is a zoonotic disease, caused by protozoa of the genus *Leishmania*, which presents the main characteristic of lesions in the skin and mucous membranes. The high toxicity, high costs and resistance of some strains to current medications stimulate the search for therapeutic alternatives for treatment this disease. Plants are rich sources of chemical compounds, among them flavonoids, steroids and diterpenes. Among the classes of diterpenes, the major constituent present in the leaves of *Sphagneticola trilobata* is grandiflorenic acid (GFA), which has anti-inflammatory, antimicrobial and antinociceptive activity. In our study, the action of GFA on promastigotes and amastigotes of *Leishmania amazonensis* was investigated. It can be observed that this compound at the concentration of 25 nM was able to significantly inhibit proliferation of promastigotes after 24h of treatment and 25-3.12 nM after 48 and 72h of exposure to GFA. This phenomenon of reduction of proliferation was accompanied by morphological changes through scanning electron microscopy (SEM), in which treatment with 25 nM GFA caused damage to the parasite morphology. Afterwards, we investigated the mechanisms involved in the death of the protozoan, with an increase in the production of reactive oxygen species (ROS), phosphatidylserine exposure and permeabilization of the parasite's plasma membrane, suggesting an apoptosis-like event. Since the GFA has action on free promastigotes forms, we studied its effect on intracellular amastigotes and macrophages infected with *L. amazonensis*, we observed that the treatment caused a reduction in the percentage of infected cells and the number of amastigotes by macrophage, without showing cytotoxicity in the peritoneal macrophages and human erythrocytes. We checked the cytokine, NO and reactivity oxygen species (ROS) production by infected macrophages, however, GFA did not cause differences in secretion of IL-1 β , IL-12, IL-6 and TNF- α , and in the synthesis of the NO and ROS. Therefore, GFA treatment acts in promastigote forms through the apoptosis-like mechanism and in directly acting intracellular amastigote forms, independent cytokines proinflammatory modulation and NO and ROS synthesis in this model. Thus, we suggest that GFA is a potential therapeutic alternative in the treatment of leishmaniasis, where the current treatment is the basis of toxic and ineffective drugs

Keywords: Leishmaniasis. Diterpene. Immunomodulation. Reactive oxygen species (ROS). Apoptosis-like.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** – Ciclo biológico do protozoário *Leishmania* spp 18
- Figura 2** – *Sphagneticola trilobata* Pruski (*Wedelia paludosa* D.C., *Acmella brasiliensis*) 26
- Figura 3** Estrutura química do ácido caurenóico e ácido grandiflorênico 27

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AC	Ácido Caurenóico
AG	Ácido Grandiflorênico
AIDS	<i>Acquired Immune Deficiency Syndrome</i>
AP-1	<i>Activator Protein 1</i>
ATP	<i>Adenosine Triphosphate</i>
B.O.D.	<i>Bioquimic Oxygen Demand</i>
BALB/c	Linhagem de Camundongos isogênicos
C57BL/6	Linhagem de Camundongos isogênicos
CO ₂	Dióxido de Carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
FITC	Isotiocianato de Fluoresceína
GIPLs	<i>Glycoinositolphospholipids</i>
H	Horas
H ₂ DCFDA	<i>2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate</i>
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
HEPES	<i>4-(2-Hydroxyethyl)piperazine-1-ethanesulfonic acid, N-(2-Hydroxyethyl)piperazine-N'-(2-ethanesulfonic acid)</i>
HSPs	<i>Heat Shock Proteins</i>
IgG	Imunoglobulina G
IL	Interleucina
IL-10	Interleucina-10
IL-13	Interleucina-13
IL-17	Interleucina-17
IL-4	Interleucina-4
INF- γ	<i>Interferon gama</i>
IP	Iodeto de propídeo
JAK	<i>Janus Kinase</i>
KDNA	<i>kinetoplast DNA</i>
LC	Leishmaniose Cutânea

LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCM	Leishmaniose Cutâneomucosa
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
mg	Miligrama
mL	Mililitro
Mm	Milímetro
mM	Milimolar
MTT	<i>3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide</i>
NAC	n-Acetilcisteína
NaCl	Cloreto de sódio
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NaNO ₂	Nitrito de sódio
NF-kB	<i>Nuclear Factor Kappa B</i>
Nm	Nanômetro
nM	Nanomolar
NO	<i>Nitric oxide</i>
O ₂ ⁻	Superóxido
°C	Graus Celsius
OH	Radicais de Hidroxila
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	<i>Phosphate-Buffered Saline (tampão fosfato)</i>
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i>
pH	Potencial hidrogeniônico
SBF	Soro Bovino Fetal
SINAM	Sistema de Informação de Agravos de Notificação
T CD4 ⁺	Linfócito T CD4 ⁺
Th1	Linfócito T auxiliar tipo 1
Th17	Linfócito T auxiliar tipo 17
Th2	Linfócito T auxiliar tipo 2
TMRE	<i>Tetramethylrhodamine ethyl ester</i>
TNF-α	<i>Tumor Necrosis Factor alpha</i>

Treg	Linfócito T regulatório
USA	<i>United States of America</i>
WHO	<i>World Health Organization</i>
Mg	Micrograma
μL	Microlitro
μM	Micromolar

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	LEISHMANIOSES.....	14
1.2	AGENTE ETIOLÓGICO E CICLO BIOLÓGICO	16
1.3	INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO E RESPOSTA IMUNE.....	18
1.4	DIAGNÓSTICO	23
1.5	TRATAMENTO	24
1.6	ÁCIDO GRANDIFLORÊNICO	25
2	JUSTIFICATIVA	29
3	OBJETIVOS	30
3.1	OBJETIVO GERAL	30
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	30
4	MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1	ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS	31
4.2	MANUTENÇÃO DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. AMAZONENSIS</i>	31
4.3	ÁCIDO GRANDIFLORÊNICO	31
4.4	ATIVIDADE DO ÁCIDO GRANDIFLORÊNICO SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS.....	32
4.5	DETERMINAÇÃO DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA CELULAR	32
4.6	DETERMINAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDILSERINA	33
4.7	PRODUÇÃO DE EROS EM FORMAS PROMASTIGOTAS DE <i>L. AMAZONENSIS</i>	33
4.8	ANÁLISE MORFOLÓGICA DE FORMAS PROMASTIGOTAS.....	33
4.9	EFEITO CITOTÓXICO EM MACRÓFAGOS PERITONEAIS	34
4.10	ENSAIO HEMOLÍTICO.....	34
4.11	ENSAIO ANTIAMASTIGOTA	35
4.12	TESTE DE RECUPERAÇÃO DE FORMAS PROMASTIGOTAS	35
4.13	MENSURAÇÃO DE CITOCINAS	35
4.14	DETERMINAÇÃO DO NITRITO COMO ESTIMATIVA DE NO.....	36
4.15	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	36

5	RESULTADOS	37
5.1	PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	38
6	CONCLUSÃO	64
7	REFERÊNCIAS	65
	ANEXOS	72
	COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL	72
	ESPECTRO DE RMN DE ¹ H	73
	ESPECTRO DE RMN DE ¹³ C.....	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 LEISHMANIOSES

As leishmanioses são um grupo de doenças parasitárias crônicas transmitidas através da picada de insetos flebotomíneos, sendo consideradas zoonoses que ocasionalmente infectam o homem e outros vertebrados. É causada por mais de 20 espécies de protozoários do gênero *Leishmania* (ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae). Podem se manifestar de diversas formas clínicas incluindo a forma visceral, cutânea e cutâneomucosa. Essa variação de formas clínicas é dependente da espécie do parasito e de aspectos patológicos e imunológicos do paciente (GENARO, 2011). Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), dentre as diferentes formas clínicas, estima-se que a Leishmaniose Visceral (LV) ocorre 300.000 casos anualmente e a Leishmaniose Cutânea (LC) apresenta 1.000.000 de casos reportados nos últimos 5 anos, além disso 1 bilhão de pessoas vivem em áreas endêmicas sob o risco de infecção (WHO, 2016).

Nas Américas, a forma cutânea é denominada de Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), na qual apresentam manifestações que variam desde a formação de úlcera única à formas disseminadas na pele, podendo ou não acometer mucosas, agrupando-se as seguintes formas:

Leishmaniose Cutânea (LC), é caracterizada pelo surgimento de úlceras únicas ou múltiplas indolores localizadas na derme, geralmente com epiderme ulcerada, tipicamente caracterizadas por bordas elevadas, contornos regulares e leito da lesão granuloso com presença ou não de exsudato purulento (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Leishmaniose Cutâneomucosa (LCM), normalmente é uma forma secundária à lesão cutânea, com aspecto mais agressivo que compromete as mucosas e cartilagens. As áreas mais comumente afetadas são boca, faringe e nariz (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Leishmaniose Cutânea Difusa (LCD), são lesões difusas não ulceradas, distribuídas amplamente na pele contendo grande número de amastigotas, com a disseminação do parasito através de vasos linfáticos ou migração de macrófagos vacuolizados repletos de parasitos, assumindo a evolução de caráter crônico e progressivo que persiste por toda a vida do paciente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Outra manifestação clínica, é a Leishmaniose Visceral (LV), também é conhecida como calazar com evolução crônica e acometimento sistêmico, pois é caracterizada por afetar os órgãos com considerável concentração de leucócitos, levando a hepatoesplenomegalia, além de febre alta, perda de peso e anemia. Quando não é tratada, se torna fatal podendo levar a óbito até 90% dos casos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2006).

O Brasil apresenta-se, em relação as Leishmanioses, como um país que requer atenção nas medidas de tratamento e controle da doença, uma vez que apresenta alta incidência das três formas clinicas da LTA (cutânea, cutâneomucosa e cutânea difusa). Segundo a OMS, 90% dos casos relatados de LT ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central, principalmente no Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã e Síria. Já a LV, 90% dos casos ocorrem no Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Os casos de LCM restringem-se quase 90% à Bolívia, Brasil e Peru (WHO, 2016).

No Brasil, a LTA tem ampla distribuição geográfica, sendo a maior área endêmica devido a sua maior extensão territorial, com registros em todos os estados brasileiros, entretanto a LV é mais frequente nas regiões Norte, Nordeste, Centro-Oeste e Sudeste (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

A LTA é endêmica no estado do Paraná com notificações em 276 dos 399 municípios (LONARDONI et al., 2006). Segundo o Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) os números de casos notificados no Paraná representam mais de 95% dos casos da região Sul e em 2015, 528 novos casos foram notificados (SINAN, 2016).

Segundo o Ministério da Saúde (2007, 2015) são identificadas nas Américas 11 espécies de *Leishmania* causadoras da LTA, dentre essas, sete já foram identificadas no Brasil, pertencente aos subgêneros *Viannia* e *Leishmania*: *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg*, *L. (V.) shawi* e *L. (V.) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis*, ambas amplamente distribuídas no Brasil. A LV é causada essencialmente por uma única espécie, *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*.

Alguns fatores são importantes na epidemiologia da leishmaniose, sendo eles fatores sociais, ambientais e climáticos, além disso um aumento expressivo do número de casos de coinfeção *Leishmania*-HIV tem sido observado desde o início da década de 1990 e há projeções de seu crescimento contínuo, devido à superposição geográfica das duas infecções e da interiorização da infecção por HIV. Nos pacientes LTA com infecção concomitante com HIV há relatos de disseminação da

doença cutânea em um processo conhecido como visceralização da LT (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015). Em pacientes com LV e HIV, há o desenvolvimento de uma LV mais agressiva, devido a sua imunossupressão (LAULETTA et al., 2016)

1.2 AGENTE ETIOLÓGICO E CICLO BIOLÓGICO

Protozoários que pertencem a ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e do gênero *Leishmania*, são os agentes etiológicos da leishmaniose. Esses parasitos são transmitidos pela fêmea do inseto vetor flebotomíneo, sendo este hospedeiro invertebrado que pertence à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, gênero *Lutzomyia* no novo mundo ou *Phlebotomus* no velho mundo. O hospedeiro invertebrado também é conhecido no Brasil como mosquito palha, birigui e tatuquira. A presença do inseto vetor é essencial para a disseminação da doença, pois são responsáveis pela transmissão dos protozoários nos hospedeiros vertebrados, outro fator determinante para esta epidemiologia são as condições climáticas típicas das regiões tropicais que favorece a proliferação do inseto vetor (WHO, 2016). As principais espécies de insetos identificadas envolvidas na proliferação da LTA são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. intermedia*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. wellcome* e *L. migonei* (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007).

Os protozoários do gênero *Leishmania* são parasitos unicelulares que possuem um ciclo biológico digenético, no qual os parasitos se reproduzem por divisão binária e apresentam-se basicamente em duas formas evolutivas, promastigotas e amastigotas. As promastigotas possuem flagelo livre, que é essencial para a mobilidade e sobrevivência do parasito, junto ao cinetoplasto (mitocôndria única que contém o DNA mitocondrial) na porção anterior do corpo celular alongado, estas formas são encontradas no tubo digestivo do inseto vetor. As amastigotas são arredondadas e sem flagelo livre, observadas principalmente em macrófagos teciduais dos hospedeiros vertebrados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2007; GLUENZ et al., 2010).

O ciclo do parasito se inicia quando a fêmea do inseto vetor flebotomíneo infectada regurgitam juntamente com a saliva formas infectantes promastigotas metacíclicas de *Leishmania* spp. ao realizar o repasto sanguíneo para se alimentar do hospedeiro vertebrado. Por possuírem peças bucais curtas e rígidas, os flebotomíneos ao realizarem a hematofagia formam um polo hemorrágico na derme, induzindo uma resposta hemostática, inflamatória e imune do hospedeiro, as quais dificultariam o sucesso do repasto sanguíneo (RIBEIRO; FRANCISCHETTI, 2003). Entretanto, *Lutzomyia* spp. possuem componentes salivares farmacologicamente ativos capazes de driblar tais respostas do hospedeiro.

Alguns peptídeos salivares interferem nas infecções por *Leishmania*, ativando células T e macrófagos, inibindo a expressão de citocinas do tipo Th1 e induzindo a expressão de citocinas Th2 por macrófagos ativados (revisto por READY, 2013). A saliva destes dípteros também mostrou-se quimiotática, induzindo o recrutamento de neutrófilos e macrófagos (ABDELADHIM et al., 2015). Vale-se destacar o mais potente vasodilatador já descrito, o peptídeo Maxadilan (LERNER et al., 2007) encontrado unicamente em *L. longipalpis*, o qual é capaz de exacerbar a infecção na mesma proporção que a saliva total (MORRIS et al., 2001), tendo diversos efeitos sobre ativação de macrófagos, prolongando a sobrevivência do parasito no hospedeiro (ROGERS; TITUS, 2003).

Durante a inoculação, formas promastigotas metacíclicas são depositadas na derme do hospedeiro, e seu principal desafio é estabelecer sua residência principalmente no interior de macrófagos sem desencadear defesas antimicrobianas (PETERS et al., 2009; RAVICHANDRAN; LORENZ, 2007).

Os macrófagos apresentam uma variedade de receptores que se ligam à padrões moleculares presentes na superfície do parasito, como moléculas de lipofosfoglicanos (LPG) e metaloproteinase gp63 kDa (GP63) iniciando o processo de fagocitose destes patógenos através da formação de pseudópodes que internalizam o parasito formando fagossomos ou vacúolos parasitóforos. Após este processo ocorre a fusão com lisossoma formando o fagolisossoma, devido a acidez neste ambiente, as formas promastigotas metacíclicas diferenciam-se em amastigotas. Essas formas se proliferam dentro dos macrófagos por divisão binária, promovendo sua ruptura e liberando os parasitos, que podem invadir novos macrófagos ou serem ingeridos por outro flebotomíneo durante o repasto sanguíneo (RAVICHANDRAN; LORENZ, 2007; KAYE; SCOTT, 2011).

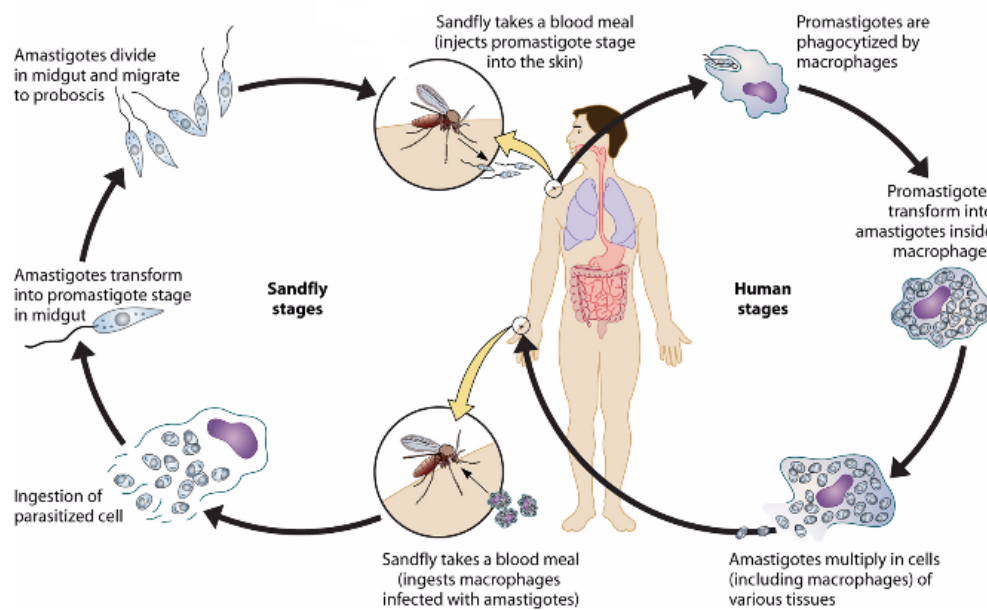


Figura 1 - Ciclo biológico do protozoário *Leishmania* spp. (ESCH; PETERSEN, 2013)

No inseto vetor, após a ingestão, estas células se diferenciam na luz do trato digestivo do inseto em formas promastigotas procíclicas flageladas e se dividem por fissão binária, fixando-se nas microvilosidades do tubo digestório do inseto vetor. Quando atingem grande número, diferenciam-se em formas promastigotas metacíclicas infectantes, que invadem as porções anteriores do estômago e proventrículo do mosquito pelo processo de diferenciação denominada metaciclogênese. No próximo repasto sanguíneo, ocorre a regurgitação destas formas infectivas que serão fagocitadas principalmente por macrófagos, formando vacúolos parasitóforos, diferenciando-se em formas amastigotas e caso consigam evadir-se dos mecanismos microbicidas, dá-se início à multiplicação destas formas, recomeçando o ciclo (KEDZIERSKI, 2010) (Figura 1).

1.3 INTERAÇÃO PARASITO-HOSPEDEIRO E RESPOSTA IMUNE NA LTA

O processo de instalação da doença decorre de alguns fatores como a resposta imune do hospedeiro e virulência do parasito. O início da infecção ocorre quando as formas promastigotas metacíclicas são inoculadas na pele e passam a ter contato com componentes salivares do vetor, sistema complemento do hospedeiro e proteoglicanos, que são moléculas de alto peso molecular encontradas na superfície do parasito. No local da picada do inseto, ocorre rápida e intensa migração celular, com infiltrado de neutrófilos e um recrutamento substancial de macrófagos, a principal célula efetora de defesa e alvo nesta parasitose. Nessa fase inicial da infecção, muitas quimiocinas e citocinas são produzidas, influenciando diretamente a resposta imune

durante a infecção por *Leishmania* (SCAPINI et al., 2000; PETERS et al., 2008). No entanto, principalmente macrófagos ativados são capazes de eliminar os parasitas intracelulares, além disso, o curso da infecção é dependente do desenvolvimento da resposta imune adaptativa, a qual está intimamente relacionada com o quadro clínico da leishmaniose (LAUNOIS et al., 1996).

Nos macrófagos, o processo de fagocitose desencadeia o *burst* oxidativo, onde é elevada a atividade respiratória da célula a fim de eliminar parasitas intracelulares. Interferon γ (IFN- γ) produzido principalmente por células T apresentam um importante papel na ativação das células infectadas. A ativação dos macrófagos leva à ativação da enzima NADPH (nicotinamida adenina dinucleótido fosfato) oxidase, que desencadeia o consumo de oxigênio com a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs), como superóxidos (O_2^-), peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radicais hidroxila (OH). Macrófagos ativados principalmente por INF- γ e fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), tem aumento na expressão da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), provocando a síntese de elevados níveis de óxido nítrico (NO), molécula com alto potencial microbicida (ASSCHE et al., 2011).

Além dos fatores acima citados, Laskay et. al. (2003) relataram o papel dos neutrófilos. Embora sejam células fagocíticas, os neutrófilos podem agir como “cavalos de tróia” ajudando formas promastigotas de *Leishmania* a estabelecer infecção. Através do estudo com *L. major*, foi observado que formas promastigotas foram facilmente fagocitadas por neutrófilos, sobrevivendo dentro dos seus fagossomas. Isto se deve porque os neutrófilos apresentam uma meia vida curta e sofrem apoptose, sendo, em seguida, fagocitados por vias silenciosas, ou seja, sem desencadear os mecanismos de defesa dos macrófagos. Após a fagocitose de neutrófilos apoptóticos, amastigotas que residiam em seu interior são capazes de estabelecer residência nos macrófagos (LASKAY; ZANDBERGEN; SOLBACH, 2003).

Para melhor compreensão sobre a resposta imune desenvolvida na resistência ou na susceptibilidade à infecção por *Leishmania* spp., vários estudos têm sido desenvolvidos em modelos murinos. A resposta imunológica do hospedeiro contra a infecção por este parasito, caracteriza-se no aumento de células T CD4⁺, com perfil de citocinas Th1 ou Th2 (SCOTT; NOVAIS, 2016).

Essa diferença na resposta imunológica é consequência não somente das diferentes espécies de *Leishmania*, mas também do predomínio genético do modelo de camundongos estudados. Sabe-se que camundongos C57BL/6 infectados com *L. major* são resistentes à infecção, enquanto que camundongos da linhagem BALB/c são

susceptíveis (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). Em C57BL/6, a resistência é estabelecida devido ativação da subpopulação de linfócitos Th1, sintetizam várias citocinas, principalmente INF- γ e TNF- α , que são responsáveis pela ativação dos macrófagos, desencadeando o *burst* oxidativo (CUNNINGHAM, 2002). A suscetibilidade à infecção em camundongos BALB/c é caracterizada pelo desenvolvimento de uma doença grave, visceralizante e geralmente fatal, baseada na ativação preferencial da subpopulação Th2, com produção de IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, o que gera incapacidade do controle parasitário (KANE; MOSSER, 2015). IL-10 e IL-4 são responsáveis por diminuição da expressão da iNOS e, conseqüentemente, da produção de NO, inibindo a eliminação de parasitos intracelulares e, por fim, gerando formas graves da doença (BRANDONISIO et al., 2001).

Estudos de infecção com *L. major* revelaram que IL-12 tem papel fundamental na geração de imunidade protetora através da ativação de células NK, células CD8+ e diferenciação da resposta Th1 com produção de IFN- γ . Quando analisadas lesões de LTA, foi constatado que a forma cutânea localizada apresentava maior quantidade de IL-12 comparadas às lesões disseminadas, que poderia ser relacionado ao prognóstico favorável e cura dessas lesões (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002; DIAZ et al., 2006).

Supõe-se que a evolução clínica da doença é determinada por um balanço entre as respostas Th1 e Th2. Além dos perfis Th1/Th2, recentemente tem se discutido o papel da resposta Th17 na evolução da doença, caracterizada principalmente pela síntese de IL-17, uma citocina pró-inflamatória que desempenha um papel importante na depuração de agentes patogênicos intracelulares. Nas lesões cutâneas a IL-17 parece exacerbar a doença através do recrutamento e ativação de neutrófilos (BANERJEE et al., 2016). Em camundongos susceptíveis à *L. major*, as células T CD4⁺ e os neutrófilos produzem quantidades mais elevadas de IL-17 em comparação aos camundongos C57BL/6, resistentes. Além disso, o tamanho da lesão em camundongos BALB/c deficientes em IL-17 foi significativamente menor, com redução na carga parasitária, quando comparados com camundongos BALB/c selvagens, relacionando esta citocina com a progressão da doença (KOSTKA et al., 2009).

Outro fator importante na progressão ou regressão da doença é a presença de células T reguladoras (Treg), responsáveis pela produção de citocinas como IL-10 e TGF- β , que tem função de controlar a resposta imune, mantendo integridade do tecido (BELKAID; TARBELL, 2009). Em camundongos susceptíveis, a resposta Th2 e a remoção das células Treg leva a exacerbação da doença (LAGES et al., 2008) e quando infectados com *L. amazonensis*, há aumento da carga parasitária favorecendo ao desenvolvimento exacerbado da patologia (BELKAID; BLANK; SUFFIA, 2006).

É complexa a interação parasito-hospedeiro em diferentes linhagens de camundongos infectados com *L. amazonensis* quando comparadas a *L. major*, pois elas

diferem em alguns aspectos como susceptibilidade à doença e desenvolvimento da lesão. Exemplo disso é o fato de que todas as linhagens isogênicas de camundongos infectados com *L. amazonensis* são capazes de desenvolver lesões progressivas, apresentando vacúolos parasitóforos repletos de parasitos (SOONG et al., 1997).

Em camundongos susceptíveis infectados com *L. amazonensis*, a ativação de células T CD4⁺ determina a patogênese desenvolvendo uma resposta Th2, sugerindo um mecanismo de susceptibilidade à doença através da produção de citocinas como IL-4, IL-10 e baixos níveis de IFN- γ (JI et al., 2005). Esse perfil de resposta Th1/Th2 em camundongos infectados com *L. amazonensis* é semelhante às infecções humanas, fazendo com que modelos experimentais envolvendo esta espécie tenham grande relevância (PEREIRA; ALVES, 2008; SILVEIRA et al., 2009).

Embora o sistema imune do hospedeiro apresente várias estratégias para combater o microorganismo, os parasitos do gênero *Leishmania* tem desenvolvido maneiras sofisticadas de subverter a resposta imune inata, permitindo a propagação da infecção em macrófagos. Atualmente, sabe-se que os parasitos utilizam algumas proteínas de superfície, como potencial fatores de virulência, entre eles estão o glicosilinositolfosfolípidos (GIPLs), LPG e GP63 (ISNARD et al., 2012).

GILPs são moléculas de baixo peso molecular que são expressas em todas as fases do ciclo do parasito, sendo mais abundantes na sua superfície. Tem como função a capacidade de modular muitas funções dos macrófagos, citocinas como TNF- α , liberação de óxido nítrico e ativação da MAPK. Sua estrutura é semelhante ao LPG contendo até sete açúcares, mas sua capacidade de modulação é dependente de sua composição de glicano, *L. infantum* sintetizam GILPs ricas em manose e *L. braziliensis* expressam GILPs ricas em galactose (ASSIS et al., 2012).

Os LPG são encontrados na superfície dos protozoários, fazendo com que as formas promastigotas metacíclicas sejam resistentes à lise mediada pelo sistema complemento, além da proteção contra radicais livres, colaborando para o retardamento da formação do fagolisossoma através da inibição local da NADPH oxidase, contribuindo com o tempo de transformação em amastigotas, forma mais resistente do parasito, ou seja o seu papel basicamente é na sobrevivência intracelular de promastigotas nos macrófagos, sendo restrito ao estabelecimento da infecção durante o processo de conversão de promastigotas em amastigotas (WINBERG et al., 2009; ASSCHE et al., 2011).

A presença da GP63 também proporciona resistência do parasito à lise mediada pelo complemento e facilita a fagocitose das formas promastigotas pelos macrófagos, sendo também responsável pela ativação das proteínas tirosina fosfatases (PTPs, SHP-1, PTP1B e TCPTP) que levam à alteração das vias JAK, MAP e IRAK-

1kinase. Essa inativação nos fatores de transcrição nucleares, tais como AP-1 e NF- κ B, inibe a atividade anti-microbiana, favorecendo assim a sobrevivência e propagação do parasita (ISNARD et al., 2012).

O primeiro mecanismo de escape das formas promastigotas é evitar a lise direta pelo sistema complemento através de componentes do glicocálice deste parasito: LPG e GP63. Estes inativam os componentes C3, C5 e C9 do sistema Complemento, inibindo as vias clássica e alternativa do Complemento e impedindo o acesso do complexo de ataque à membrana (C5b-C9). Além disso, a inativação de C3b para C3bi na superfície do parasito funciona como uma opsonina, facilitando a ligação com receptores do complemento tipo 1 e 3 (CR1 e CR3) nos macrófagos sem estimular o aumento da atividade respiratória da célula e consequentemente as defesas antimicrobianas (BOGDAN et al., 1996; UENO; WILSON, 2012).

Além desses receptores, os macrófagos apresentam uma variedade de receptores que se ligam diretamente à padrões moleculares presentes na superfície do parasito, como moléculas de LPG e a GP63 iniciando o processo de fagocitose destes patógenos. A internalização das formas promastigotas metacíclicas nos fagossomos dá início a um processo de maturação e fusão com lisossomos e endossomos tardios, originando o fagolisossomo, compartimento com lúmen ácido, constituído por várias hidrolases ácidas ativas. O parasito consegue atrasar esse processo devido a presença do lipofosfoglicano (LPG) na sua membrana afim de que o processo de diferenciação para as formas amastigotas seja completado, resultando em formas mais adaptadas ao pH deste compartimento (ANTOINE et al., 1998; WINBERG et al., 2009). A glicoproteína GP63 também possui ação proteolítica degradando enzimas lisossomais, oferecendo resistência ao parasito para sobrevivência no ambiente ácido do fagolisossoma, de modo a permitir a propagação da infecção dentro dos macrófagos do hospedeiro mamífero (ISNARD et al., 2012).

Adicionalmente, sabe-se que a arginina é um aminoácido fundamental para a sobrevivência da *Leishmania spp*, contudo ela também é utilizada pela enzima iNOS como doador nitrogenado que converte nitrito e nitrato para a produção de NO, uma molécula microbicida que é produzida por macrófagos ativados. Com isso, estes parasitas apresentam uma enzima denominada arginase, que tem a capacidade de consumir a arginina, resultando na redução da produção de NO (ASSCHE et al., 2011).

1.4 DIAGNÓSTICO

As leishmanioses têm diferentes manifestações clínicas podendo reproduzir outras doenças infecciosas, dessa forma as alterações podem ser citológicas e histológicas. Dependendo da endemicidade da região, pacientes apresentam sintomas sistêmicos inespecíficos, como febre ou achados nos exames físico ou clínico, como esplenomegalia.

Além da avaliação da sintomatologia, o diagnóstico pode ser realizado através de exames laboratoriais, sendo eles direto por microscopia, histopatologia e cultura parasitária, e indireto através de diagnósticos sorológicos e moleculares.

Dentre os métodos direto, o exame microscópico é realizado através de esfregaços, raspagens de lesões ou biópsias, com a finalidade de identificar diretamente as formas amastigotas com núcleo e cinetoplasto evidenciados através da coloração de Giemsa (GOTO; LINDOSO, 2014).

O exame histopatológico do tecido, é obtido através da biópsia de punção incisional ou excisional e deve incluir a borda da úlcera ou nódulo do tecido afetado. Na leishmaniose cutânea, a epiderme pode apresentar hiperplasia e ulceração, tendo um infiltrado dérmico denso e difuso ou granuloma, com a presença de macrófagos cheios de amastigotas (HANDLER et al., 2015).

Os testes imunológicos mais utilizados para o diagnóstico da leishmaniose são RIFI e ELISA, onde pode-se detectar anticorpos específicos ou antígenos do parasito *Leishmania* spp, apresenta alta sensibilidade e especificidade, respectivamente. RIFI é o teste padrão ouro de referência para diagnóstico humano, sendo também utilizado no diagnóstico da leishmaniose canina. A titulação padrão deste teste, foi estabelecida entre 1:40 a 1:80.

Outra forma de diagnóstico de LC é através do teste intradérmico ou teste de Montenegro, um marcador de resposta imunológica celular de alta sensibilidade (86,4 a 100%) e baixa especificidade, com o objetivo de avaliar a reação de hipersensibilidade tardia do paciente. As reações cutâneas de hipersensibilidade são consideradas positivas a partir de ≥ 5 mm e negativas < 5 mm, quando os pacientes apresentam o resultado negativo, a confirmação diagnóstica deve ser feita por outros testes, pois pode ocorrer uma recidiva culminando na cura da lesão mas não na cura parasitária (ANTONIO et al., 2014).

Entre os métodos indiretos utilizados na pesquisa, também tem os diagnósticos moleculares, que são os testes de amplificação dos ácidos nucleicos. A reação em cadeia da polimerase (PCR) e PCR quantitativo em tempo real (qPCR) é um ensaio qualitativo ou quantitativo, respectivamente, onde são amplificados, detectados e

quantificados diferentes genes do parasito, a partir de ácido desoxirribonucleico (DNA) ou mini nuclear cinetoplasto (kDNA) da *Leishmania* spp. (JARA et al., 2013)

1.5 TRATAMENTO

Atualmente a maioria das opções terapêuticas disponíveis para a leishmaniose estão associadas a toxicidade e efeitos colaterais dos fármacos. As formas de tratamento se baseia no uso de antimoniais pentavalentes como antimonato de *N*-metil glucamina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostam®), sendo os compostos de primeira escolha. Em casos de resistência do parasito, efeitos adversos ou contraindicação aos antimoniais, outros fármacos podem ser utilizados como Pentamidina e Anfoterecina B, mas não possuem um índice terapêutico tão favorável, requerendo maior tempo de tratamento, além da administração parenteral e apresentarem várias reações adversas (TIUMAN et al., 2011).

Os antimoniais são utilizados como tratamento desde os últimos 60 anos, tendo como alvo específico as formas amastigotas com a localização intramacrofágica, sendo capaz de realizar necessariamente sua redução química dentro do hospedeiro. Embora seja a medicação mais utilizada, o mecanismo de ação não é claramente descrito, sua atuação não é tão eficaz e a resistência parasitária levantaram sérios desafios para o desenvolvimento de novas drogas (MOHAPATRA, 2014). Acredita-se que o antimônio pentavalente possa ser uma pró-droga, que após convertido em trivalente, inibe a triponationa redutase, interfere na β -oxidação de ácidos graxos e glicólise do parasito, aumentando o efluxo de tióis intracelular levando a uma depleção de ATP intracelular e expondo o parasito ao estresse oxidativo do hospedeiro (BALANÃ-FOUCE et al., 1998).

A anfoterecina B é utilizada como antifúngico, formando poros na membrana da célula fúngica ou de espécies de *Leishmania*, se ligando ao ergosterol (principal esteroide presente na membrana), isso altera sua permeabilidade e permite a saída de íons como Na^+ , K^+ e Mg^{2+} , levando a morte celular (LINCOPAN; MAMIZUKA; CARMONA-RIBEIRO, 2005). Devido a sua baixa seletividade, pode se ligar também ao colesterol presente na membrana das células do hospedeiro, causando lesão celular, levando a efeitos colaterais como inapetência, náuseas, vômitos, sensação de plenitude gástrica, pirose, dor abdominal, prurido, febre, fraqueza, cefaleia, tontura, insônia, edema, insuficiência renal aguda (CZUB; BOROWSKI; BAGINSKI, 2007).

O mecanismo de ação da Pentamidina inclui a inibição da síntese de poliaminas, um nutriente para *Leishmania*. Os efeitos adversos após sua utilização incluem hipotensão, hipoglicemia, diabetes, nefrotoxicidade, taquicardia (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

Outros efeitos colaterais desses medicamentos incluem mialgia, artralgia, aumento sérico das enzimas hepáticas, pancreatite, disfunção gastrintestinal, dores musculares difusas, enrijecimento das articulações, arritmias, pancitopenia, insuficiência renal reversível e cardiotoxicidade. Além da contra-indicação aos hepatopatas, cardiopatas, nefropatas e gestantes (OLIVEIRA et al., 2011; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015).

No entanto estes fármacos apresentam variação na efetividade contra diferentes espécies, resistência parasitária que reduz a eficácia dos medicamentos convencionais e a aplicação clínica incorreta favorece o desenvolvimento da resistência do parasito, além da dificuldade de administração e o alto custo (NATERA et al., 2007).

Além disso, a recuperação completa da lesão após o tratamento pode durar meses e até anos, e esse período pode ser caracterizado pelo comprometimento da função, susceptibilidade a infecção secundária e o desenvolvimento de cicatrizes permanentes e desfigurantes no tecido lesionado (HODIAMONT et al., 2014).

A diversidade de espécies de *Leishmania*, co-infecções, recidiva e a falha terapêutica em imunodeprimidos são fatores que motivam a busca por novos fármacos. Principalmente em indivíduos que são imunocomprometidos com HIV ou outros distúrbios malignos, pois não são capazes de eliminar os parasitos pelo mecanismo natural de defesa, fazendo com que a leishmaniose passe a ser uma infecção oportunista favorecendo o desenvolvimento de lesões cancerígenas, afetando negativamente o diagnóstico e o curso da doença (KOPTERIDES et al., 2007; LAULETTA; CUNHA; QUEIROZ, 2016).

Neste contexto, acreditamos que a pesquisa é um importante recurso para o desenvolvimento de produtos naturais com potencial agente terapêutico contra esta parasitose, os extratos naturais ou compostos isolados provenientes de plantas, são uma fonte rica de novos fármacos antiprotozoários. A atividade dos extratos e compostos derivados de plantas tem sido atribuída aos diversos compostos que contém vários grupos químicos, incluindo alcalóides, flavonóides, fenilpropanóides, esteróides e terpenóides, com isso a composição química pode potencializar a ação leishmanicida, anti-inflamatória e imunomoduladora para resolver os fenômenos fisiopatológicos dessa doença (ROCHA et al., 2005; ULLAH et al., 2016).

1.6 ÁCIDO GRANDIFLORÊNICO

Sphagneticola trilobata Pruski (*Wedelia paludosa* D.C., *Acmella brasiliensis*) (Asteraceae) é uma planta herbácea com caule castanho-avermelhado e

folhas opostas, encontrada em várias regiões do Brasil, principalmente nos estados de Pernambuco, Bahia, Minas Gerais, São Paulo e Santa Catarina, atualmente vem sendo utilizada para fins ornamentais e medicinais, é popularmente conhecida como “pseudo-arnica”, “margaridão” ou “pingo-de-ouro” (Figura 2) (AGRA et al., 2008; BRESCIANI; CECHINEL-FILHO; YUNES, 2000).



Figura 2 - *Sphagneticola trilobata* Pruski (*Wedelia paludosa* D.C., *Acmella brasiliensis*) (Asteraceae) (Flora Avancine, disponível em: <http://avancine.com.br/produto/vedelia/>)

Estudos fitoquímicos prévios demonstraram ausência de alcaloides nessa planta, sendo a maior concentração de compostos de natureza terpênica, fenólica (flavonoides) e esteroidal. Cada parte da planta (raiz, caule, folha e flor) possui uma constituição química diferente, porém apresentam similaridade entre os compostos encontrados (FILHO et al., 2004; BACCARIN et al., 2009).

Na medicina popular, essa espécie vegetal é amplamente conhecida por atuar no tratamento de doenças respiratórias, infecciosas, com ação analgésica, expectorante e anticonvulsivo. Além disso, apresenta propriedades biológicas como antinociceptivo (BLOCK et al., 1998; MIZOKAMI et al., 2012), tripanocida (CHIARI et al., 1996) e antifúngico (SARTORI et al., 2003), entre outros.

Dentre os principais constituintes desta planta, destacam-se os diterpenos pertencente a classe dos terpenos que são constituídos por 20 átomos de carbono, tendo como compostos majoritários o ácido caurenóico (AC) (*ent-kaur-16-en-19-oic acid*) e ácido grandiflorênico (AG) (*ent-kaur-9(11),16-dien-19-oic acid*) (BACCARIN et

al., 2009; BATISTA et al., 2009). Sabe-se que esses dois compostos são semelhantes, diferindo apenas uma dupla ligação de hidrogênio na sua estrutura química, que alteram significativamente as propriedades biológicas desses compostos (Figura 3), tais como citotoxicidade contra ovos de artemia salina, atividade antiplasmodial contra *P. falciparum* e citotoxicidade em células antineoplásicas (BATISTA et al., 2009; BATISTA et al., 2013).

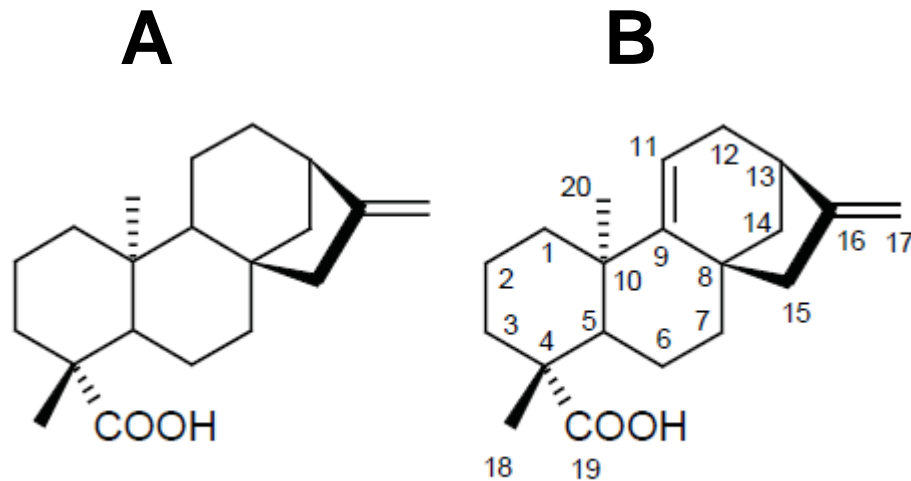


Figura 3 - Estrutura química do ácido caurenóico (*ent*-kaur-16-en-19-oic acid) (A) e ácido grandiflorênico (*ent*-kaur-9(11),16-dien-19-oic acid) (B) (BATISTA; BRAGA; OLIVEIRA, 2005).

Os diterpenos do tipo caurânicos também são encontrados em outros gêneros de plantas como *Xylopia*, *Annona* e *Mikania* e em todo reino vegetal, porém em menores concentrações. Diterpenos caurânicos são precursores biossintéticos de várias substâncias do metabolismo de fungos e plantas, incluindo hormônios de crescimento como giberelinas (BATISTA et al., 2009; BATISTA; BRAGA; OLIVEIRA, 2005).

Estudos demonstraram que o ácido caurenóico (AC) apresenta diversas propriedades biológicas descritas, tais como antiprotozoária (BATISTA; DE OLIVEIRA; CHIARI, 1999; BATISTA et al., 2007; MACRI et al., 2014), anti-inflamatória (MIZOKAMI et al., 2012; LIM et al., 2009; CHOI et al., 2011), antimicrobiana (WILKENS et al., 2002), antinociceptiva (MIZOKAMI et al., 2012), vasorelaxante (TIRAPELLI et al., 2004), antioxidante e hipotensor (TIRAPELLI et al., 2010), indutor do reparo tecidual através da inibição da produção das citocinas hiperalgênicas TNF- α e IL-1 β , sem apresentar toxicidade em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (MIZOKAMI et al., 2012). Além disso, também foi observado efeito diurético e cardiovascular devido a sua atividade natriurética, demonstrando baixo efeito citotóxico contra microcrustáceo *Artemia salina* com CL₅₀ abaixo de 0.5–5.0 ng/mL (SOMOVA et al., 2001).

A atividade leishmanicida de diterpenóides do óleo de copaíba se dá através da despolarização de membrana mitocondrial em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (DOS SANTOS et al., 2013), o AC tem atividade imunomoduladora através da ativação das citocinas pro-inflamatórias (IFN- γ , IL-1 β , TNF- α) e antioxidante através do TRAP em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (MACRI et al., 2014) e efeito leishmanicida através do aumento da produção de NO, dependente de cNOS, induzindo a produção da citocina pró-inflamatória IL-1 β por via de sinalização NLRP12 (MIRANDA et al., 2015) sobre formas amastigotas de *Leishmania amazonensis*.

Alguns estudos demonstraram que o diterpenóide AG exerce atividades biológicas como a capacidade de eliminar as formas tripomastigotas de *Trypanosoma cruzi* na concentração de 0.68 mg/ml (BATISTA; DE OLIVEIRA; CHIARI, 1999), atividade antibacteriana com MIC de 15.62 g/mL contra *S. aureus* e 7.81 g/mL contra *S. epidermidis*, além de manter a viabilidade celular de fibroblastos L929 de camundongos e promover um efeito protetor contra o estresse oxidativo induzido por peróxido de hidrogênio, sugerindo sua utilização para cicatrização tecidual (BALEKAR et al., 2012), também é indutor da sinalização de apoptose na linhagem celular de macrófagos RAW 264.7 (HUESO-FALCÓN et al., 2010). Entretanto, foi evidenciado a toxicidade do composto AG, isolado da *Sphagneticola trilobata* Pruski (*Wedelia paludosa* D.C.) contra *Artemia salina* apresentando CL₅₀ de 29.8 mg/mL (BATISTA et al., 2009). No entanto, pouco se sabe sobre as atividades biológicas exercidas pelo diterpenóide AG.

Devido à escassez de estudos sobre o AG e suas atividades biológicas, este trabalho teve como objetivo verificar a capacidade leishmanicida deste composto sobre formas promastigotas livres e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, bem como elucidar os mecanismos de microbicidas envolvidos.

2 JUSTIFICATIVA

A presença de fatores como alta toxicidade dos fármacos, dificuldade de administração, longo tempo de tratamento e o surgimento de cepas resistentes fazem com que a terapia da LTA não seja satisfatória. A toxicidade destes agentes e a persistência de efeitos secundários mesmo após a modificação do nível de dose e da duração do tratamento são, no entanto, graves. Os fármacos alternativos, tais como anfotericina B e pentamidina, também apresentam efeitos colaterais desagradáveis, dificultando o tratamento. Porém principalmente o surgimento de cepas resistentes e a localização intramacrofágica da forma infecciosa são problemas graves que necessitam de soluções urgentemente.

Na ausência de uma vacina efetiva, existe uma necessidade urgente de medicamentos eficazes para substituir ou suplementar aqueles em uso corrente. Os fármacos clinicamente utilizados, muitas dos quais baseados em compostos de antimônio pentavalente, foram desenvolvidas antes de 1959 e são utilizadas até hoje.

Portanto, sabendo da gravidade desta doença, de suas complicações anatomofisiológicas, de administração dependente de ambiente ambulatorial, de elevada toxicidade, associado ao surgimento de cepas com diferentes sensibilidades e resistência aos fármacos disponíveis, faz-se necessário e urgente, a busca de novos fármacos para o tratamento da LTA. Dessa forma, estudos tem demonstrado que extratos naturais e seus compostos isolados apresentam propriedades antiprotozoária e anti-inflamatória, justificando a busca por compostos como novas fontes de tratamento para leishmaniose que sejam mais eficazes e menos tóxicas para o hospedeiro.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar *in vitro* o efeito do tratamento com ácido grandiflorênico isolado da planta *Sphagneticola trilobata* Pruski (*Wedelia paludosa* D.C.) sobre formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar *in vitro* a ação leishmanicida direta do ácido grandiflorênico (AG) sobre formas promastigotas.
- Caracterizar os mecanismos de morte envolvidos durante a ação direta deste tratamento sobre as formas promastigotas.
- Analisar as alterações morfológicas das formas promastigotas após o tratamento com ácido grandiflorênico.
- Determinar *in vitro* a citotoxicidade do ácido grandiflorênico sobre macrófagos peritoneais murinos e eritrócitos humanos.
- Avaliar a atividade anti-amastigota exercida pelo tratamento com AG em macrófagos infectados.
- Investigar o efeito imunomodulador e mecanismos microbicidas do ácido grandiflorênico sobre macrófagos infectados ou não com *L. amazonensis*.

4 MATERIAIS E METÓDOS

4.1 ANIMAIS E ASPECTOS ÉTICOS

Os camundongos BALB/c foram gentilmente fornecidos pelo Instituto Carlos Chagas/Fiocruz-PR, Curitiba, Brasil. Os animais foram mantidos em condições estéreis no Biotério do Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina até atingirem o peso aproximado de 25-30 gramas e idade entre 6-8 semanas, com luminosidade e temperatura controlada. Foi utilizado ciclo de claro/escuro (12/12 h), com temperatura mantendo-se em torno de $22\pm 2^{\circ}\text{C}$. O estudo foi aprovado e os animais foram utilizados de acordo com as normas do Comitê de Ética em Experimentação Animal da Universidade Estadual de Londrina (UEL), sob o registro 13134.2016.62 (Anexo 1).

4.2 MANUTENÇÃO DAS FORMAS PROMASTIGOTAS DE *LEISHMANIA AMAZONENSIS*

As formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1989/166MJO) provenientes da Universidade Estadual de Maringá foram mantidas em meio de cultura 199 (GIBCO Invitrogen, New York, EUA) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF) (GIBCO invitrogen, New York, EUA), meio Hepes 1M, urina humana 1%, L-glutamina 1%, estreptomicina com penicilina (GIBCO Invitrogen) e a 10% bicarbonato de sódio. O cultivo celular foi mantido em estufa do tipo B.O.D. a 25°C , em frasco de cultura 25 cm^2 . Em todos os experimentos, foram utilizadas formas promastigotas na fase de crescimento estacionária (cultura de 5 dias).

4.3 ÁCIDO GRANDIFLORÊNICO (AG)

O AG utilizado neste trabalho foi obtido a partir da planta *Sphagneticola trilobata* Pruski (*Wedelia paludosa* D.C.). O extrato bruto foi obtido a partir de raízes secas, que foram secadas em evaporador rotativo, com posterior solubilização em solução hidroetanólica (9:1) e particionado com n-hexano e diclorometano, todos os solventes foram secos sob pressão reduzida. A fração de hexano foi submetida a cromatografia líquida a vácuo (CLV) aumentando a polaridade do gradiente. A segunda fração produziu um composto amorfo (200 mg), o qual foi lavado com metanol frio e analisado por métodos de cromatografia líquida de alta resolução (HPLC), obtendo-se um composto com 96% de pureza. A identificação foi realizada por Ressonância Magnética Nuclear de ^1H e ^{13}C (RMN) (Bruker Avance Model III, 400 MHz para ^1H e 100

MHz para ^{13}C), utilizando CDCl_3-d_1 como solvente e comparação com dados da literatura (COSTA; ALBUQUERQUE; VICHNEWSKI, 1996). O ponto de fusão (PF) foi determinado em aparelho de placa quente (Microquímica MQAPF 302). O AG apresentou PF de 149-154°C. A solução mãe de AG foi dissolvida em dimetilsulfóxido a 1% (DMSO) (Invitrogen-Gibco). Contudo, a concentração de DMSO não excedeu 0,1% em todos os experimentos.

ent-kaur-9(11),16-dien-19- oic acid: rendimento (200mg), sólido branco, PF 149-154°C; NMR ^1H (400 MHz, CDCl_3-d_1) 1.05 (s, 3H), 1.27 (s, 3H), 1.50-2.80 (m, 18H), 4.82 (s, 1H), 4.94 (s, 1H), 5.26 (t, J = 3.12 Hz, 1H). RMN ^{13}C (100 MHz, CDCl_3-d_1) 18.44 (CH_2), 20.10 (CH_2), 23.60 (CH_3), 28.20 (CH_3), 29.60 (CH_2), 37.90 (CH_2), 38.20 (CH_2), 38.80 (C), 40.70 (CH_2), 41.20 (C), 42.20 (C), 44.73 (C), 44.90 (CH_2), 46.60 (CH), 50.30 (CH_2), 105.4 (CH_2), 114.9 (CH), 155.9 (C), 158.5 (C), 184.5 (C=O).

4.4 ATIVIDADE DO ÁCIDO GRANDIFLORÊNICO SOBRE FORMAS PROMASTIGOTAS DE *L. AMAZONENSIS*

As formas promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^6 células/mL) foram tratadas com diferentes concentrações de AG (3.12, 6.25, 12.50, 25 nM), que foram determinadas e reduzidas com base na literatura. Os parasitas foram contados em uma câmara de Neubauer após 24, 48 e 72 h de tratamento. Como controle negativo, utilizou-se as promastigotas de *L. amazonensis* mantidas em meio de cultura sem tratamento, controle do veículo utilizou-se DMSO 0,01 % e controle positivo, utilizou-se Anfotericina B.

4.5 DETERMINAÇÃO DA INTEGRIDADE DA MEMBRANA CELULAR

Formas promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^6 cel/mL) foram tratadas com 25 nM de AG durante 24h à 25°C, em seguida coletadas, lavadas com PBS e incubadas diretamente com iodeto de propídio (IP) (Sigma, St. Louis, MO, USA) (0.50 $\mu\text{g/mL}$) durante 5 min de acordo com as instruções do fabricante. A análise dos parasitas foi realizada imediatamente utilizando um leitor de fluorescência de microplacas (Victor X3, PerkinElmer, Finland) com excitação de 480 nm e comprimento de onda de emissão de 580 nm. A digitonina (Sigma, St. Louis, MO, USA) (40.0 μM) foi usada como controle positivo. Os valores da fluorescência foram normalizados para o número total de células de cada tratamento.

4.6 DETERMINAÇÃO DA EXPOSIÇÃO DE FOSFATIDILSERINA

A exposição de fosfatidilserina foi detectada utilizando Anexina-V FITC (Invitrogen, Eugene, EUA), uma proteína de ligação de fosfolípido dependente de cálcio usado como um marcador de apoptose. Formas promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^6 cel/mL) foram tratadas com 25 nM de AG por 24 h à 25°C. Depois disso, os parasitos foram lavados e ressuspensos em 100 µL de tampão de ligação (140 mmol NaCl, 5 mM CaCl₂ e 10 mM HEPES-Na, em pH 7.4), seguido pela adição de 5 µL da Anexina V FITC durante 15 min à temperatura ambiente. Após a incubação, foi adicionado 400 µL de tampão de ligação. A Camptotecina (Sigma, St. Louis, MO, USA) (10 µM) foi utilizada como controle positivo. A obtenção dos dados foi realizada utilizando um leitor de fluorescência de microplacas (Victor X3, PerkinElmer, Finland) a um comprimento de onda de excitação de 488 nm e um comprimento de onda de emissão de 520 nm. A fim de comparar o tratamento com o controle, os valores obtidos da fluorescência foram normalizados para o respectivo número de células.

4.7 PRODUÇÃO DE EROS EM FORMAS PROMASTIGOTAS E MACRÓFAGOS INFECTADOS COM *L. AMAZONENSIS*

Foram avaliados a produção de EROs, onde formas promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^6 cel/mL) foram tratadas com 25 nM de AG e macrófagos infectados com amastigotas (5×10^5) foram tratados com 25, 12.50 e 6.25 nM de AG por 24 horas. Após este período os parasitos e as células foram lavados com PBS e carregadas com 10µM da sonda permeante diacetato 2',7'-diclorofluoresceína (H₂DCFDA) (Sigma St. Louis, MO, USA) e incubadas no escuro por 45 minutos à 25°C (parasitos) ou 30 minutos à 37°C (macrófagos). Como controle positivo, foi utilizado o peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por 30 minutos. EROs foram mensurados como um aumento na fluorescência causada pela conversão do corante não fluorescente para o altamente fluorescente 20,70-diclorofluoresceína, com um comprimento de onda de excitação de 488 nm e emissão de 530 nm em um leitor de microplaca de fluorescência (Victor X3, PerkinElmer, Finland).

4.8 ANÁLISE MORFOLÓGICA DE FORMAS PROMASTIGOTAS POR MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA

A análise morfológica foi realizada através de microscopia eletrônica de varredura (MEV) de acordo com Da Silva et al. (2013), onde as formas promastigotas de

L. amazonensis (1×10^6) foram tratadas com 25 nM de AG e incubadas durante 24 horas, os parasitos foram coletados, lavados com PBS e fixados com 2,5% de glutaraldeído em 0,1 M de tampão cacodilato de sódio contendo CaCl_2 1 mM. Após a fixação, as amostras foram colocadas em lamínulas tratadas com poli-L-lisina. Em seguida as amostras foram desidratadas com banhos graduais de etanol, ponto crítico seco em CO_2 , revestido com ouro, e foram observados em microscópio eletrônico de varredura.

4.9 VIABILIDADE DE MACRÓFAGOS PERITONEAIS

Os efeitos citotóxicos do AG em macrófagos peritoneais foram testadas com base na oxidação mitocondrial por MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio) (Sigma, St. Louis, MO, EUA) como ensaio descrito por Mosmann (1983).

Os macrófagos (5×10^5 cel/ml) foram recuperados a partir da cavidade peritoneal com PBS gelado suplementado com 3% de SBF e, em seguida, cultivados em placas de 24 poços com 500 μL de meio RPMI 1640 (10% de SBF) durante 24 horas (37°C , 5 % de CO_2). As células aderentes foram incubadas com AG (6.25, 12.50, 25, 250 e 500 nM), controle negativo com meio RPMI e controle do diluente com DMSO 0.01%, cultivadas durante 24 h, sob as mesmas condições.

Após este período, a cultura foi lavada com PBS e adicionado MTT (5 mg/mL) aos poços, seguido de outra incubação por um período de quatro horas. O produto MTT (cristais de formazan) foi diluído com 300 μL de DMSO (Sigma, St. Louis, MO, EUA), transferidos para placas de 96 poços e a leitura foi realizada com um espectrofotômetro (Thermo Scientific, Multiskan GO) à 550 nm.

Os resultados foram expressos em porcentagem de viabilidade em relação ao grupo de controle calculado com a seguinte fórmula: % (macrófagos viáveis) = (amostras tratadas com AD / amostra não tratada) x 100.

4.10 ENSAIO HEMOLÍTICO

A fim de avaliar a toxicidade do composto em hemácias de indivíduos saudáveis, realizamos a análise da atividade hemolítica, uma análise importante para determinar se os tratamentos podem causar efeitos adversos, como anemia. Foram coletados sangue de indivíduos saudáveis com tubo à vácuo heparinizado, e os eritrócitos foram lavados 3 vezes com PBS (centrifugação a 1000 rpm por 10 minutos). Foi preparada uma suspensão de hemácias 2% com PBS. O tratamento 6.25, 12.50, 25, 250 e 500 nM de AG foi incubado 1:1 em um volume total de 200 μL , com a suspensão de 2% de hemácias em placa de 96 poços por 3 horas a 36°C à 5% de CO_2 . Como

controle negativo foi utilizado PBS e como controle positivo água destilada para hemólise. As placas foram centrifugadas a 1000 rpm por 10 minutos, e os sobrenadantes foram coletados e analisados pela leitura da absorbância a 550 nm. Esse experimento foi realizado em duplicata e repetido por três vezes.

4.11 ENSAIO ANTIAMASTIGOTA

Macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c (5×10^5 cel/mL) foram cultivados em placas de 24 poços contendo lamínulas de vidro de 13 mm, incubados com 500 μ L de meio RPMI 1640 por 24 horas à 37°C e 5% CO₂. Os macrófagos aderentes foram infectados com formas promastigotas de *L. amazonensis* ($2,5 \times 10^6$) por 2 horas. Após a infecção, as formas promastigotas não internalizadas foram removidas por lavagem com PBS e as células aderentes foram tratadas com AG (6.25, 12.50 e 25 nM), meio RPMI 1640 (controle negativo), DMSO 0,01% (veículo), anfoterecina B (controle positivo) por 24 horas (37°C, 5% CO₂). Em seguida, as células foram coradas com Giemsa (Laborclin, Pines-PR Brazil) e 20 campos foram analisados por imersão aumentada (ampliação de 1000x), usando um microscópio óptico (Olympus BX41, Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) para determinar o índice de eliminação e o número de amastigotas após 24 horas de tratamento com o AG.

4.12 TESTE DE RECUPERAÇÃO DE FORMAS PROMASTIGOTAS

Ensaio de recuperação de formas promastigotas foi realizado como descrito por Da Silva et al. (2013). Brevemente, os macrófagos peritoneais foram infectados com *L. amazonensis* tratados com concentrações do AG nas mesmas condições descritas no protocolo do ensaio leishmanicida em formas amastigotas. Após 24 horas de tratamento, a cultura celular foi lavada com PBS e incubadas com meio de cultura 199 a 24 °C, a fim de induzir a diferenciação de amastigotas intracelulares em formas promastigotas. Promastigotas recuperados foram contadas em câmara de Neubauer durante cinco dias consecutivos, após o tratamento.

4.13 MENSURAÇÃO DE CITOCINAS

Os sobrenadantes do ensaio anti-amastigota foram utilizados para medir os níveis de factor alfa de necrose tumoral (TNF- α), interleucina (IL)-6 e IL-12 por ensaio imunoenzimático (ELISA), de acordo com as instruções do fabricante (eBiosciences®),

EUA). As placas foram lidas a 450 nm utilizando um leitor de placas ELISA (Thermo Scientific, Multiskan GO).

4.14 DETERMINAÇÃO DO NITRITO COMO ESTIMATIVA DOS NÍVEIS DE NO

O óxido nítrico (NO) foi determinado pelo método de Griess. Resumidamente, alíquotas de sobrenadantes do ensaio de anti amastigota (60 µL) foram centrifugadas a 5000 rpm durante 2 min e um volume de 50 µL de sobrenadante foi recuperado e adicionou-se 50 µL de reagente de Griess (sulfanilamida a 1% e 0,1% de naftililodiamino-bicloridrato em ortofosfórico (H₃PO₄) 5%). Após 10 min de incubação à temperatura ambiente, as amostras foram colocadas em microplacas de 96 poços. Uma curva padrão foi feita usando diluições seriadas de NaNO₂, e a absorbância foi determinada a 550 nm em leitor de microplacas (Thermo Scientific, Multiskan GO).

4.15 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram determinadas por ANOVA, seguido pelo teste de Tukey para comparações múltiplas. Três experimentos independentes foram realizados, cada um com conjuntos de dados em triplicata. Os dados foram expressos como média ± erro padrão da média. Os dados foram analisados usando o software estatístico GraphPad Prism (GraphPad Software, Inc., EUA, 500,288). p-valor ≤ 0,05 foi considerado estatisticamente significativo.

5 RESULTADOS

Os resultados obtidos neste trabalho foram apresentados e discutidos em um artigo científico que será submetido à revista *Acta tropica*, com fator de impacto 2.270.

5.1 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

GRANDIFLORENIC ACID PROMOTES DEATH OF PROMASTIGOTES FORMS BY *APOPTOSE-LIKE* MECHANISM AND AMASTIGOTE INDEPENDENT OF NITRIC OXIDE PRODUCTION

Bruna Taciane da Silva Bortoleti¹; Fernanda Tomiotto-Pellissier¹; Milena Menegazzo Miranda-Sapla¹; Manoela Daiele Gonçalves²; João Paulo Assolini¹; Amanda Cristina Machado Carloto¹; Priscila Goes Camargo³; Idessania Nazareth Costa¹; Ivete Conchon-Costa¹; Nilton Syogo Arakawa²; Wander Rogério Pavanelli^{1*}

¹Laboratory of Experimental Protozoology, Department of Pathological Sciences, Center of Biological Sciences, State University of Londrina, PR, Brazil.

² Laboratory of Biotransformation and Phytochemistry, Department of Chemistry, Center of Exact Sciences, State University of Londrina, PR, Brazil.

³ Laboratory of Research on Bioactive Molecules, Department of Chemistry, Center of Exact Sciences, State University of Londrina, PR, Brazil.

* Corresponding Author: Wander Rogério Pavanelli

Department of Pathological Sciences, Laboratory of Protozoology the State University of Londrina - UEL. Rodovia Celso Garcia Cid Campus, Zip Code 86057-970, Posta box 10.011. Londrina, PR.

Phone: + 055 43 33714539

Email: wanderpavanelli@gmail.com<http://h>

Abstract

American Tegumentary Leishmaniasis (ATL) is a zoonotic disease, caused by protozoa of the genus *Leishmania*, which presents the main characteristic of lesions in the skin and mucous membranes. The high toxicity, high costs and resistance of some strains to current medications stimulate the search for therapeutic alternatives for treatment this disease. Plants are rich sources of chemical compounds, among them flavonoids, steroids and diterpenes. Among the classes of diterpenes, the major constituent present in the leaves of *Sphagneticola trilobata* is grandiflorenic acid (GFA), which has anti-inflammatory, antimicrobial and antinociceptive activity. In our study, the action of GFA on promastigotes and amastigotes of *Leishmania amazonensis* was investigated. It can be observed that this compound at the concentration of 25 nM was able to significantly inhibit proliferation of promastigotes after 24h of treatment and 3.12-25 nM after 48 and 72h of exposure to GFA. This phenomenon of reduction of proliferation was accompanied by morphological changes through scanning electron microscopy (SEM), in which treatment with 25 nM GFA caused damage to the parasite morphology. Afterwards, we investigated the mechanisms involved in the death of the protozoan, with an increase in the production of reactive oxygen species (ROS), phosphatidylserine exposure and permeabilization of the parasite's plasma membrane, suggesting an apoptosis-like event. Since the GFA has action on free promastigotes forms, we studied its effect on intracellular amastigotes and macrophages infected with *L. amazonensis*, we observed that the treatment caused a reduction in the percentage of infected cells and the number of amastigotes by macrophage, without showing cytotoxicity in the peritoneal macrophages and human erythrocytes. From the anti-amastigote assay supernatant, we checked for cytokine and NO levels, however, GFA did not cause differences in secretion of IL-1 β , IL-12, IL-6 and TNF- α , and in the synthesis of the microbicidal compound NO. Therefore, GFA treatment acts in promastigote forms through the apoptosis-like mechanism and in directly acting intracellular amastigote forms, independent of proinflammatory cytokine modulation, NO and ROS synthesis in this model. Thus, we suggest that GFA is a potential therapeutic alternative in the treatment of leishmaniasis, where the current treatment is the basis of toxic and ineffective drugs.

Keywords: Leishmaniasis, diterpene, immunomodulation, reactive oxygen species (ROS), apoptosis-like.

1. Introduction

Leishmaniasis is a neglected tropical disease caused by more than 20 protozoan species of the genus *Leishmania*, which presents as a complex set of clinical manifestations including the visceral form, localized, mucosal or diffuse skin lesions [1] [2]. Currently, more than one billion people live in endemic areas at risk of developing one of the forms of the disease [3]. In the Americas, the cutaneous form, known as American Tegumentary Leishmaniasis (ATL), is one of the most widespread forms, *Leishmania (Leishmania) amazonensis* being the causal agent of cutaneous and diffuse form, and may or not affect the mucosa or even progress to the form visceral disease [4].

ATL treatment is based primarily on the use of pentavalent antimonials such as N-methyl glucamine antimoniate and sodium stibogluconate. However, these drugs present a variation in effectiveness against the different species that cause ATL, in addition to presenting extensive parasitic resistance [5]. Amphotericin B and Pentamidine, are also indicated in cases of parasite resistance or contraindication to antimonials. All the mentioned drugs present adverse effects to the patient, among them cardiotoxicity, hepatotoxicity, nephrotoxicity and muscular pain, being contraindicated to hepatopathies, cardiac patients, nephropathies and pregnant women [6] [7].

Due to the adversities of available treatment for leishmaniasis, the search for new therapies that associate leishmanicidal activity with low toxicity to the host is necessary [8]. In this context, an important resource is the research, development and use of natural products as therapeutic agents, especially those derived from plants [9]. Promising classes include diterpenes that form a large class of secondary metabolites with a broad spectrum of important biological activities such as anti-inflammatory action [10], antimicrobial [11] and antispasmodic [12] [13].

Diterpenes are the main constituents of the *Sphagneticola trilobata* (*Wedelia paludosa* D.C.) (Asteraceae) plant, found in several regions of Brazil, with the major components being kaurenoic acid (KA) (ent-kaur-16-en-19-acid) and grandiflorenic acid (GFA) (ent-kaur-9(11), 16-dien-19-oic acid) [14] [15]. These two compounds differing only by a double bond in their chemical structure which significantly alters the biological properties of this compounds, such as antiplasmodial activity against *P. falciparum*, cytotoxicity against brine shrimp eggs and neoplastic cells [16] [15]. Studies have shown that kaurenoic acid has several described biological properties, such as antiprotozoal *in vivo* and *in vitro* against *T. cruzi* [17] [18], anti-inflammatory *in vivo* inhibiting TNF- α , IL-1 β , PGE₂ [19],

in vitro inhibiting COX₂, iNOS and PGE₂ in RAW 264.7 cells [20] [21], antimicrobial against gram-positive bacteria as *B. cereus* and *E.coli* [22], analgesic through activation of the NO–cyclic GMP–protein kinase G–ATP-sensitive potassium channel signaling pathway [19], vasodilator [23], hypotensive [24], immunomodulatory increasing IL-1 β , IL-10 and antioxidant increasing TRAP and MDA on macrophages murines [25]. It has been previously described that KA isolated from *Sphagneticola trilobata* Pruski (*Wedelia paludosa* D.C.) the copaiba oil and the plant show leishmanicidal activity on promastigote forms of *L. amazonensis* [26] [27]. In addition, Miranda et al. (2015) demonstrated NO-dependent anti-amastigote activity in macrophages infected with *L. amazonensis* through the activation of NLRP12, IL-1 β and cNOS-dependent signaling pathways [27].

Although some biological activities carried out by GFA have been described, such as its trypanocidal activity [17], antibacterial [28], inducing the signaling of apoptosis in RAW cells [29] and tissue repair [18], its activity in *Leishmania* spp remain to be investigated. Thus, this article aimed to investigate the leishmanicidal capacity of this compound on free promastigotes forms and intracellular amastigotes of *L. amazonensis*, as well as elucidate the mechanisms of death on promastigote forms and immunomodulatory action on infected macrophages.

2. Materials and methods

2.1 Culture of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

The promastigotes of *L. (L.) amazonensis* (MHOM/BR/1989/166MJO) were maintained in culture medium 199 (GIBCO, Invitrogen, New York, USA) supplemented with 10%-fetal bovine serum (FBS) (GIBCO, Invitrogen, New York, USA), 1M-HEPES buffer, 1%-human urine, 1%-L-glutamine, streptomycin and penicillin (GIBCO, Invitrogen) and 10%-sodium bicarbonate. The cell culture was maintained in a B.O.D at 25°C in 25 cm² culture flask. In all experiments, promastigote forms in the stationary growth phase were used (5-day culture).

2.2 Animals and Ethics Committee

BALB/c mice were kindly provided from the Institute Carlos Chagas/Fiocruz-PR, Curitiba, Brazil. The animals weighing approximately 25-30 grams and aged 6-8 weeks were kept under sterile conditions and used according to protocols approved by the Institutional

Animal Care and Committee. This study was approved by the Ethics Committee for Animal Experimentation of the State University of Londrina (13134.2016.62).

2.3 Plant Material

The air-dried roots of *Sphagneticola trilobata* were collected in August 2015 at Horto de Plantas Mediciniais of Centro de Ciências Agrárias at Universidade Estadual de Londrina (UEL) (23°32'64"-51°20'63"). A voucher specimen was deposited at the "Herbarium of Universidade Estadual de Londrina (FUEL)" no. 49306, collected by one of the authors (N.S.A.)

2.4 Grandiflorenic acid (GFA)

GFA used in this paper was obtained from *Sphagneticola trilobata*. The crude extract was obtained from the air-dried roots of *Sphagneticola trilobata* were pulverized and extracted with dichloromethane and dried under rotatory reduced pressure, the crude extract was re-dissolved in hydroethanolic solution (H₂O: EtOH-9:1) partitioned with *n*-hexane and dichloromethane, all solvents were dried under reduced pressure. The hexane fraction was subjected to vacuum liquid chromatography (VLC) by increasing gradient polarity (Hex: AcOet:MeOH). The second fraction produced an amorphous compound (200mg), which was washed with cold methanol and analyzed by high performance liquid chromatography (HPLC), yielding 96% purity. The identification was performed by ¹H and ¹³C nuclear magnetic resonance (NMR) (Bruker Avance Model III, 400 MHz for ¹H and 100 MHz for ¹³C), utilizing CDCl₃-*d*₁ as solvent and comparison with literature data [30]. The melting point (MP) was determined on hot plate apparatus (Microquímica MQAPF 302). The grandiflorenic acid presented MP of 149-154°C. The stock solution of GFA was dissolved in 1% dimethyl sulfoxide (DMSO) (Invitrogen-Gibco). However, DMSO concentration did not exceed 0.1% in all experiments.

ent-kaur-9(11),16-dien-19- oic acid: yield (200mg), white solid, MP 149-154°C; NMR ¹H (400 MHz, CDCl₃-*d*₁) 1.05 (*s*, 3H), 1.27 (*s*, 3H), 1.50-2.80 (*m*, 18H), 4.82 (*s*, 1H), 4.94 (*s*, 1H), 5.26 (*t*, *J* = 3.12 Hz, 1H). NMR ¹³C (100 MHz, CDCl₃-*d*₁) 18.44 (C6), 20.14 (C2), 23.60 (C20), 28.24 (C18), 29.66 (C7), 37.92 (C12), 38.23 (C3), 38.80 (C10), 40.75 (C1), 41.24 (C13), 42.27 (C8), 44.73 (C4), 44.94 (C14), 46.60 (C5), 50.30 (C15), 105.49 (C17), 114.90 (C11), 155.94 (C16), 158.55 (C9), 184.54 (C19).

2.5 Grandiflorenic Acid activity against *L. amazonensis*

L. amazonensis promastigote forms (1×10^6 cells/mL) were treated with different concentrations of GFA (3.12, 6.25, 12.50 and 25 nM). Parasites were counted in a Neubauer chamber after 24, 48 and 72 h of treatment. As a negative control, we used *L. amazonensis* promastigote maintained in culture without treatment, for the positive control we used Amphotericin B (AmB) ($1 \mu\text{M}$) and the control DMSO (0.1%) for diluent.

2.6 Morphological analysis of promastigote forms by Scanning Electron Microscopy

The morphological analysis was performed using scanning electron microscopy (SEM) according to Silva et al. (2013) [31] with some modifications. The promastigote forms of *L. amazonensis* (1×10^6) were treated with 25 nM GFA and incubated for 24 hours at 25°C , the parasites were collected, washed with PBS. The samples were placed in coverslips treated with poly-L-lysine and fixed overnight with 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M-sodium cacodylate buffer containing 1 mM- CaCl_2 . The samples were washed three times for 15 minutes with 0.1 M cacodylate buffer, followed by one-hour incubation with osmium tetroxide (OsO_4) in the dark and again washed with 0.1 M cacodylate buffer. After fixation, the samples were then dehydrated with graded ethanol baths. The critical point was carried out with a Critical Point Dryer (PCD 030—BAL-TEC) on stubs for recovery with 30nm gold, using a Sputter coater (SCD 050—BAL-TEC). Samples were analyzed using an FEI QUANTA 200 scanning electron microscope (SEM).

2.7 Promastigotes and infected macrophages Reactive Oxygen Species (ROS) generation

In order to evaluate the ROS generation, *L. amazonensis* promastigote forms (1×10^6 cells/mL) were treated with 25 nM of GFA and infected macrophages with 25, 12.50 and 6.25 nM of GFA for 24 h. After the incubation period, the parasites and cells were washed in PBS (pH 7.4) and loaded with $10 \mu\text{M}$ of a permeant probe diacetate 2',7'-dichlorofluorescein (H2DCFDA) (Sigma, St. Louis, MO, USA) and incubated in the dark (promastigotes: 45 min, 25°C) (macrophages: 30 min, 37°C , 5% CO_2). Reactive oxygen species (ROS) were measured as an increase in fluorescence caused by the conversion of non-fluorescent dye to highly fluorescent 20,70-dichlorofluorescein, with an excitation wavelength of 488 nm and emission wavelength of 530 nm in a fluorescence microplate reader (Victor X3, PerkinElmer, Finland).

2.8 Determination of phosphatidylserine exposure

Phosphatidylserine exposure was detected using Annexin-V FITC (Invitrogen, Eugene, USA), a calcium-dependent phospholipid binding protein used as an apoptosis marker. Promastigotes (1×10^6 cells/mL) were treated with 25 nM of GFA for 24 h at 25°C. Afterward, the parasites were washed and resuspended in 100 μ L of binding buffer (140 mM NaCl, 5 mM CaCl₂, and 10 mM HEPES-Na, pH 7.4), followed by the addition of 5 μ L of the calcium-dependent phospholipid binding protein Annexin-V FITC for 15 min at room temperature. After the incubation, binding buffer (400 μ L) was then added. Promastigotes maintained in culture without treatment was used as negative control. Data acquisition was performed using a fluorescence microplate reader (Victor X3, PerkinElmer, Finland) at an excitation wavelength of 488 nm and emission wavelength of 520 nm. In order to compare the different treatments the fluorescent values obtained were normalized to the respective number of cells.

2.9 Determination of cellular membrane integrity

Promastigotes (1×10^6 cells/mL) treated with 25 nM of GFA for 24h at 25°C were harvested, washed with PBS and directly incubated with propidium iodide (PI) (Sigma, St. Louis, MO, USA) (0.50 μ g/mL) for 5 min according to the manufacturer's instructions. Immediately thereafter, the parasites were analyzed using a fluorescence microplate reader (Victor X3, PerkinElmer, Finland) with an excitation wavelength of 480 nm and emission wavelength of 580 nm. Promastigotes maintained in culture without treatment was used as negative control. The fluorescent values obtained were normalized to the total number of cells of each treatment.

2.10 Viability of peritoneal macrophages

The cytotoxic effects of GFA in peritoneal macrophages were tested based on mitochondrial oxidation by MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide) (Sigma, St. Louis, MO, USA) assay as described by Mosmann (1983) [32]. Macrophages (5×10^5 cells/mL) was recovered from peritoneal cavity with cold PBS supplemented with 3%-FBS and then cultured in 24-well plates with 200 μ L of RPMI 1640 medium (10%-FBS) for 2 h (37°C, 5% CO₂). Adherent cells were incubated with GFA (6.25, 12.50, 25, 250 and 500 nM) and cultured for 24 h under the same conditions. After this period, the culture was washed with PBS, and added MTT (0.33 mg/mL), followed by further incubation for 4 h. The MTT product (formazan crystals) was diluted with 300 μ L of dimethyl

sulfoxide (DMSO) (Sigma, St. Louis, MO, USA), transferred to 96-well plates and reading with a spectrophotometer (Thermo Scientific, Multiskan GO) to 550 nm. The results were expressed as percentage of viability compared to the control group calculated with the following formula: % (viable macrophages) = (samples of the treated GFA/sample OD untreated) x 100.

2.11 Hemolytic Assay

In order to evaluate erythrocytes cell viability of healthy subjects, we performed the hemolytic test, an important analysis to determine whether treatments could cause adverse effects, such as anemia. Blood was collected from healthy subjects with heparinized vacuum tube, and the erythrocytes were washed 3 times with PBS (centrifugation at 1000 rpm for 10 minutes). A 2%-erythrocytes suspension was prepared with PBS. The GFA treatments 6.25, 12.50, 25, 250 and 500 nM were incubated 1:1 in a total volume of 200 μ L, with the suspension of 2%-erythrocytes in 96-well plate for 3 hours at 36° C at 5% CO₂. As a negative control, PBS was used as the positive control and distilled water for hemolysis. The plates were centrifuged at 1000 rpm for 10 minutes, and the supernatants were collected and analyzed by reading the absorbance at 550 nm. This experiment was performed in duplicate and repeated three times.

2.12 Antiamastigote assay

Peritoneal macrophages (5×10^5 cells/mL) were cultured in 24-well plates containing 13 mm glass coverslips and incubated with 200 μ L of RPMI 1640 medium for 2h at 37°C and 5% CO₂. The adherent macrophages were infected with *L. amazonensis* promastigotes (1×10^6) for 2h at 37°C and 5% CO₂. After infection, non-internalized promastigotes were removed by washing with PBS and the cells treated with GFA (6.25, 12.50 and 25 nM), RPMI 1640 medium (negative control), AmB 1 μ M (positive control) and DMSO 0.01% (control diluent) for 24h (37°C, 5% CO₂). Then, cells were stained with Giemsa (Loboclin, Pinhal-PR Brazil) and 20 fields analyzed by soaking increased using an optical microscope (Olympus BX41, Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan) (1000x magnification) to determine the elimination index and the number of amastigotes after 24 hours of GFA treatment. The supernatant was stored for measurement of cytokines and nitric oxide.

2.13 Promastigote recovery test

Promastigotes recovery assay was performed as previously described by Da Silva et al. (2013). In brief, peritoneal macrophages were infected with *L. amazonensis* and treated with concentrations of GFA at the same conditions described in anti-amastigote assay protocol. After 24 h of treatment, the cell culture was washed with PBS and incubated with 199 culture medium at 24°C in order to induce differentiation of intracellular amastigotes in promastigote forms. Recovered promastigotes were counted in a Neubauer chamber for four consecutive days after treatment (48, 72, 96 e 120h).

2.14 Cytokines measurement

The anti-amastigote assay supernatants were used to measure tumor-necrosis factor alpha (TNF- α), interleukin (IL)-1 β , IL-6 and IL-12 levels by Enzyme-Linked Immunosorbent assay (ELISA), according with the manufacturer's instructions (eBiosciences®, USA). Plates were read at 450 nm using ELISA plate reader (Thermo Scientific, Multiskan GO).

2.15 Determination of nitrite as estimative of NO levels

Nitric oxide (NO) was determined by the Griess method. Briefly, supernatant aliquots (60 μ L) of anti-amastigote assay supernatants were centrifuged at 5000 rpm for 2 min and a volume of 50 μ L the supernatant was recovered and added 50 μ L of Griess reagent (1% sulfanilamide and 0.1% of naftiletlenodiamino-bicloridrato in orthophosphoric acid (H₃PO₄) 5 %). After 10 min incubation at room temperature, the samples were placed in 96-well microplates. A calibration curve was made using serial dilutions of NaNO₂, and the absorbance was determined at 550 nm on microplate reader (Thermo Scientific, Multiskan GO).

2.16 Statistical analysis

Data were expressed as mean \pm standard error of the mean. Three independent experiments were performed, each with duplicate datasets. Data were analyzed using the GraphPad Prism statistical software (GraphPad Software, Inc., USA, 500.288). Significant differences between the groups were determined by one-way ANOVA, followed by Tukey's test for multiple comparisons. Differences were considered statistically significant when $p \leq 0.05$.

3. Results

3.1 Grandiflorenic acid exerted leishmanicidal effect on promastigote forms.

In the first experiments, we investigated the direct activity of the GFA compound on promastigotes of *L. amazonensis*. Different concentrations of GFA were tested (25, 12.50, 6.25, 3.12 nM) at times 24, 48 and 72 hours. After 24 hours of treatment, the concentration of 25 nM GFA inhibited $45.72\% \pm 16.3$ of the promastigote forms proliferation differing from the positive control ($p \leq 0.05$). After 48 and 72 hours, all concentrations of GFA tested reduced more than 60% of proliferation of promastigote forms when compared to control ($p \leq 0.0001$). The treatment with 1 μ M AmB inhibited 100% of *L. amazonensis* proliferation after 24h (Figure 1). As treatment with the concentration of 25 nM GFA showed the best results in reducing proliferation, this concentration was chosen to proceed with the following experiments.

3.2 Morphological changes in promastigotes forms treated with GFA.

The morphological changes in promastigotes caused by GFA treatment (25 nM) were evaluated by MEV. Microscopy demonstrated morphological changes when parasites were treated for 24 hours, which included signs of rounding, shrinkage of the body and damage to the parasite's plasma membrane (Figure 2b, c). Untreated protozoa have typical features, such as elongated body and similar proportions between body size and flagellum (Figure 2a).

3.3 GFA promotes increased production of reactive oxygen species, phosphatidylserine exposure and damage to the plasma membrane in promastigotes forms by apoptose-like mechanism.

Knowing that GFA has a direct effect on promastigote forms of *L. amazonensis*, we decided to investigate the mechanism of death that would be involved in the elimination of this parasite.

The effects of total ROS production on GFA treated promastigotes were evaluated through the H2DCFDA probe. The results showed that there was an increase in the total production of ROS in the promastigote forms treated with GFA when compared to the control group (Figure 3a).

In order to verify the type of cell death promoted by the compound, we used Annexin V, a marker that binds to phosphatidylserine exposed in apoptotic cells. Our data demonstrated that the treated parasites had increased Annexin V labeling relative to the control group (Figure 3b).

After these results, we also evaluated the integrity of the plasma membrane of the parasites. For this, the protozoa were incubated with PI, fluorescent marker capable of crossing ruptured cell membranes, binding to nucleic acids. We observed a significant increase in PI labeling in the treated promastigotes when compared to the control group (Figure 3c). These results demonstrate that the major leishmanicidal mechanism provoked by GFA treatment was apoptose-like resulting from increased production of reactive oxygen species leading to phosphatidylserine exposure and membrane damage of promastigotes.

3.4 GFA showed no cytotoxic and hemolytic effect at the concentrations tested.

In order to evaluate if treatment with GFA has a toxic effect on murine macrophages, the MTT test was performed, where it was verified that the treatment with the highest concentrations of GFA (500 and 250 nM) presented cytotoxicity in the evaluated period (24 hours), reducing metabolism mitochondrial cells ($74\% \pm 0.92$ and $47.8\% \pm 9.7$, respectively) (Figure 4). The concentrations of 25, 12.50 and 6.25 nM did not reduce the mitochondrial metabolism when compared to the control and were chosen to continue the studies.

In order to complement the cytotoxicity data, the hemolytic potential of the compound was evaluated. The concentrations of 25, 12.50 and 6.25 nM did not show any hemolytic activity (Table 1).

3.5 GFA showed leishmanicidal action on intracellular amastigote forms.

We performed a phagocytic assay to determine the leishmanicidal effect of GFA on *L. amazonensis*-infected macrophages. Murine peritoneal macrophages infected with *L. amazonensis* promastigotes were treated with GFA for 24h. The percentage of infected macrophages and number of amastigotes by macrophage were evaluated.

Initially we observed that after 24 hours of infection, the control group and DMSO presented 65.5% and 59.5% of infected macrophages, respectively, not differing from each other. When GFA treatment at concentrations of 25, 12.5, 6.25 nM, the percentage of

infected cells was significantly reduced in 95.2, 95.9 and 92.9% respectively ($p < 0.0001$) (Figure 5a).

In addition, the number of amastigotes per macrophage was also reduced with the treatment of GFA 25, 12.5, 6.25 nM in 82.9%, 66.5%, and 50%, respectively ($p < 0.0001$) (Figure 5b), in relation to the macrophage control group Infected and untreated. It is important to emphasize that GFA treatment was similar to AmB-treated cells, both in relation to the infected cell % and in the number of amastigotes per cell.

To confirm the capacity of GFA to enhance the elimination of intracellular parasites, we performed a promastigote recovery assay. After GFA treatments for 24h, the infected macrophage culture was washed and incubated with 199 culture medium at 24° C in order to induce the differentiation of amastigote intracellular into promastigote forms. Thereafter, recovered promastigotes were counted in a Neubauer chamber for four consecutive days (48, 72, 96 and 120h). In the results, we can confirm the decrease of the promastigote forms recovered at all concentrations tested at 48, 96 and 120 hours (Figure 6a, c, d). At 72 hours, these forms were reduced at concentrations of 25 and 12.5 nM (Figure 6b).

3.6 GFA did not modulate cytokine synthesis.

In order to verify if the leishmanicidal action triggered by GFA involved an immunomodulatory effect in macrophages, the cytokine levels was performed by ELISA. Our results showed that infection with *L. amazonensis* increased TNF- α levels, but GFA treatment was not able to modulate this cytokine. IL-6 and IL-12 levels did not differ in any of the conditions tested (infected and uninfected macrophages) (Figure 7). IL-1 β levels were below the detection levels in the kit (8 pg/ml) (data not shown).

3.7 GFA do not induce NO and ROS production in infected macrophages.

Macrophages are the most important cell involved on *Leishmania*-immune response, and NO/ROS production by these cells consists of the main defense mechanisms against this parasite. Our results showed that infected macrophages treated with GFA did not have altered NO and ROS levels compared to control group (Figure 8a, b). Possibly due to the inability of GFA to stimulate TNF- α and IL-1 β syntheses, as seen in the previous results.

4. Discussion

Due to the high toxicity and side effects of the current treatments of leishmaniasis, it is increasingly necessary to search for new compounds for the treatment of this parasitosis, in order to develop new therapeutic properties, increase efficacy and reduce toxicity [33].

In the recent decades, the development of synthetic drugs caused disaffection toward natural products as an attractive resource for search of new chemotherapeutic compounds. However, the emergence of some limitations in the use of synthetic drugs as high toxicity, side effects, and elevated costs caused by the shift in situation and interest in the field of ethnobotanical research [34] [35].

In fact, several studies have shown that diterpenes isolated from different plants demonstrate biological activities. In this sense, in the present study, the action of grandiflorenic acid (GFA), isolated from *Sphagneticola trilobata* (*Wedelia paludosa* DC) on promastigote forms of *L. amazonensis* was evaluated. GFA reduced parasite proliferation, corroborating the microbial action of this compound as demonstrated in others *in vitro* studies such as the antiprotozoal activity on trypomastigote forms of *Trypanosoma cruzi* [17] [18], antimicrobial activity against *S. aureus* and *S. epidermidis* [28] and antimalarial activity against *P. falciparum* [16].

In addition, we verified significant and vital morphological changes in *L. amazonensis* promastigotes after GFA treatment, demonstrating the direct action of this diterpene on the parasite. Similar results have previously been reported with representatives of this class diterpene as the clerodane compound [36] and diterpenoids present in copaiba oil [37] on *L. donovani* e *L. amazonensis*, respectively. However, there is no previous data have been found to demonstrate which mechanism of death is induced by GFA.

Many mechanisms of death have been described not only in multicellular organisms, but also in trypanosomatid protozoans such as *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania* spp. The induction of apoptosis, where energy-dependent cellular self-destruction occurs. Some characteristics of this phenomenon can be highlighted, such as cell shrinkage, mitochondrial membrane depolarization, nuclear fragmentation, phosphatidylserine exposure, condensation and chromatin degradation [38] [39] [40].

It is known that apoptotic signaling can be induced by some intracellular modifications such as increased reactive oxygen species, decreased antioxidants, mitochondrial dysfunctions and interruption of homeostasis [41]. The promastigote forms of *Leishmania* spp. have a single mitochondria that is clearly involved in apoptosis induced by

oxidative stress, through the production of reactive oxygen species [42] [36]. With this in mind, we investigated the levels of EROs, as expected, the increase of these molecules in promastigote forms treated with GFA.

In order to confirm this event, we investigated the pathways of death in parasites after treatment with GFA and our results demonstrated that treatment with GFA promotes an increase in the labeling of annexin V and propidium iodide in the parasites. Considering the data presented, we can infer that the manifestations in the parasite after the GFA treatment suggest the occurrence of an apoptosis-like death, where the programmed cell death occurs with changes in the morphological appearance that include cell shrinkage and mechanisms of death like exposition of phosphatidylserine at the cell surface, being common in trypanosomatid parasites that present a complex biological cycle involving insect vector and mammalian hosts [38] [42] [43].

In order to continue the tests in amastigotes forms and known that some diterpenes, including kaurenoic acid and oil resin of *Copaifera* spp. do not cause red cell membrane lysis [44] and peritoneal macrophages [25], so we decide to evaluate the cytotoxic activity of GFA on BALB/c peritoneal macrophages. In our study, we found that the lower concentrations tested did not have toxic action on erythrocytes nor altered the mitochondrial viability of peritoneal macrophages of BALB/c mice. After confirming that GFA does not present a cytotoxic effect, we chose to investigate the action of this compound on macrophages infected with *L. amazonensis*.

We observe that the treatment reduced the number of infected macrophages and the number of intracellular parasites as well as the number of promastigote forms cells recovered from infected and treated cells. Our data corroborate previous studies that have shown that compounds of the same class of GFA, such as kaurenoic acid and diterpenoid type abietans that have action on amastigote forms of *L. amazonensis* in peritoneal macrophages [27] and axenic amastigote forms of *L. donovani* [45], respectively. We chose to investigate by which mechanism these forms would be eliminated, through the immunomodulation of cytokines and production of the NO microbicidal compound or direct activity on the parasites. Our results demonstrate that GFA treatment was not able to alter proinflammatory cytokines neither NO levels. These results do not corroborate with the findings found in diterpene kaurenoic acid, which induced an increase in the synthesis of NO levels dependent cNOS, due to induction of NLRP12 and elevated IL-1 β production in infected macrophages [27].

However, our findings showed that there was no induction of reactive oxygen species in macrophages during *Leishmania* infection, these data corroborate previous studies

in diterpene kaurenoic acid that does not produce ROS in macrophages infected with *L. amazonensis* [27].

Therefore, the GFA showed substantial *in vitro* antileishmanial activity in *L. amazonensis*-infected macrophages without triggering a proinflammatory response. Although it is known that the activation of a microbicidal response with proinflammatory cytokines, NO and ROS production is fundamental for the elimination of intramacrophagic forms, we observed that GFA treatment even without inducing this activation, was able to eliminate the parasite, possibly by direct mechanisms to be investigated.

Not all diterpenes have the same effects proposed by Santos et. al (2013), furthermore, these data are the first further studies determine the death mechanisms involved of GFA in *Leishmania amazonensis*.

References

1. Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet*. 2005;366.
2. Borghi SM, Fattori V, Conchon-costa I, Pinge-filho P, Pavanelli WR, Verri Jr WA. Leishmania infection : painful or painless ? *Parasitol Res. Parasitology Research*; 2016; doi:10.1007/s00436-016-5340-7
3. WHO/Department of Control of Neglected Tropical Diseases. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. *Wkly Epidemiol Rec*. 2016; 285–296.
4. Barral A, Pedral-sampaio D, Jr GG, Momen H, McMahon-pratt D, Jesus ARDE, et al. LEISHMANIA IN BAHIA , BRAZIL : EVIDENCE THAT PRODUCES A WIDE SPECTRUM OF CLINICAL DISEASE. *Am J Trop Med Hyg*. 1991;44.
5. Croft SL, Olliaro P. Leishmaniasis chemotherapy — challenges and opportunities. *Clin Microbiol Infect*. 2011; doi:10.1111/j.1469-0691.2011.03630.x
6. Oliveira LF, Schubach AO, Martins MM, Passos SL, Oliveira R V, Marzochi MC, et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. *Acta Trop. Elsevier B.V.*; 2011;118: 87–96. doi:10.1016/j.actatropica.2011.02.007
7. Sundar S, Chakravarty J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. *Inf Heal*

- Care. 2015; 1–16. doi:10.1517/14656566.2015.973850
8. Tiuman TS, Santos AO, Dias BP, Nakamura C V. Recent advances in leishmaniasis treatment. *Int J Infect Dis.* 2011;15. doi:10.1016/j.ijid.2011.03.021
 9. Rates SMK. Plants as source of drugs. *Toxicon.* 2001;39: 603–613.
 10. Erharuyi; Adhikari, Achyut; Falodun, Abiodun; Jabeen, Almas; Erharuyi O. Cytotoxic, Anti-inflammatory, and Leishmanicidal Activities of Diterpenes Isolated from the Roots of *Caesalpinia pulcherrima*. *Planta Med.* 2016;
 11. Sartori MRK, Pretto JB, Cruz AB, Bresciani LF V, Yunes RA, Sortino M, et al. Antifungal activity of fractions and two pure compounds of flowers from *Wedelia paludosa* (*Acmela brasiliensis*) (Asteraceae). *Pharmazie.* 2003; 567–569.
 12. Baccelli C, Navarro I, Abad A, Morel N. Vasorelaxant Activity of Diterpenes from *Croton zambesicus* and Synthetic Trachylobanes and Their Structure - Activity Relationships. *J Nat Prod.* 2007; 910–917.
 13. Lozoya X, Enriques RG, Bejar E, Girn AVEH, Ponce-monter H, Gallegos AJ. The zoapatle V — The effect of kauradienoic acid upon uterine contractility. *Contracept J.* 27: 267–279.
 14. Baccarin T, Czepula AI, Ferreira RA, Lucinda-silva RM. Análise morfoanatómica das partes aéreas de *Wedelia paludosa* DC. (*Acmela brasiliensis*, *Sphagneticola trilobata*), Asteraceae. *Brazilian J Pharmacogn.* 2009;19: 612–616.
 15. Batista R, Brandão GC, Braga FC, Oliveira AB. Cytotoxicity of *Wedelia paludosa* D.C. extracts and constituents. *Brazilian J Pharmacogn.* 2009;19: 36–40.
 16. Batista R, García PA, Angeles M, Miguel JM, Speziali NL, Varotti FDP, et al. Synthesis, cytotoxicity and antiplasmodial activity of novel ent-kaurane derivatives. *Eur J Med Chem. Elsevier Masson SAS;* 2013;62: 168–176. doi:10.1016/j.ejmech.2012.12.010
 17. Batista R, De Oliveira A, Chiari E. Trypanosomicidal Kaurane Diterpenes from *Wedelia paludosa*. *Planta Med.* 1999; 2–4. doi:10.1055/s-2006-960781
 18. Batista R, Humberto JL, Chiari E, De Oliveira AB. Synthesis and trypanocidal activity of ent-kaurane glycosides. *Bioorg Med Chem.* 2007;15: 381–391. doi:10.1016/j.bmc.2006.09.048
 19. Mizokami SS, Arakawa NS, Ambrosio SR, Zarpelon AC, Casagrande R, Cunha TM, et al. Kaurenoic Acid from *Sphagneticola trilobata* Inhibits Inflammatory Pain: Effect on Cytokine Production and Activation of the NO–Cyclic GMP–Protein Kinase G–ATP-Sensitive Potassium Channel Signaling Pathway. *J Nat Prod.* 2012;

- doi:dx.doi.org/10.1021/np200989t
20. Lim H, Jung HA, Choi JS, Kim YS, Kang SS, Kim HP. Anti-inflammatory Activity of the Constituents of the Roots of *Aralia continentalis*. 2009;32: 1237–1243.
doi:10.1007/s12272-009-1909-3
 21. Choi RJ, Shin EM, Jung HA, Choi JS, Kim YS. Inhibitory effects of kaurenoic acid from *Aralia continentalis* on LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages. *Phytomedicine*. Elsevier GmbH.; 2011;18: 677–682.
doi:10.1016/j.phymed.2010.11.010
 22. Wilkens M, Alarcón C, Urzúa A, Mendoza L. Characterization of the Bactericidal Activity of the Natural Diterpene Kaurenoic Acid. *Planta Med*. 2002; 3–5.
 23. Tirapelli CR, Ambrosio SR, Da Costa FB, Coutinho ST, De Oliveira DCR, De Oliveira AM. Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. *Eur J Pharmacol*. 2004;492: 233–241.
doi:10.1016/j.ejphar.2004.04.003
 24. Tirapelli CR, Ambrosio SR, Oliveira AM De, Tostes RC. Hypotensive action of naturally occurring diterpenes: A therapeutic promise for the treatment of hypertension. *Fitoterapia*. Elsevier B.V.; 2010;81: 690–702. doi:10.1016/j.fitote.2010.05.018
 25. Macri JA, Da Silva SS, Miranda MM, Kawakami NY, Hayashida TH, Madeira TB, et al. Immunomodulatory and Antioxidant properties of Kaurenoic acid on macrophages of BALB/c in Vitro. *Am J Immunol*. 2014;10: 183–188.
doi:10.3844/ajisp.2014.183.188
 26. Dos Santos AO, Izumi E, Ueda-Nakamura T, Dias-Filho BP, Veiga-Júnior VF, Nakamura CV. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2013;108: 59–64.
 27. Miranda MM, Panis C, Santos S, Macri JA, Kawakami NY, Hayashida TH, et al. Kaurenoic Acid Possesses Leishmanicidal Activity by Triggering a NLRP12/IL-1B/cNOS/NO Pathway. *Mediators Inflamm*. 2015;2015.
 28. Balekar N, Nakpheng T, Katkam NG, Srichana T. Wound healing activity of ent-kaura-9(11),16-dien-19-oic acid isolated from *Wedelia trilobata* (L.) leaves. *Phytomedicine*. Elsevier GmbH.; 2012;19: 1178–1184. doi:10.1016/j.phymed.2012.07.014
 29. Hueso-Falcón I, Girón N, Velasco P, Amaro-Luis JM, Ravelo AG, Heras B de las, et al. Synthesis and induction of apoptosis signaling pathway of ent-kaurane derivatives. *Bioorganic Med Chem*. Elsevier Ltd; 2010;18: 1724–1735.
doi:10.1016/j.bmc.2009.11.064

30. Costa FB, Albuquerque S, Vichnewski W. Diterpenes and Synthetic Derivatives from *Viguiera aspillioides* with Trypanomicidal Activity. *Planta Med* 62. 1996;62: 557–559.
31. Da Silva SS, Thomé G da S, Cataneo AHD, Miranda MM, Felipe I, Guadalupe C, et al. Brazilian Propolis Antileishmanial and Immunomodulatory Effects. *Evidence-Based Complement Altern Med*. 2013;
32. Mosmann T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival : Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. *J Immunological Methods*. 1983;65: 55–63.
33. Ullah N, Nadhman A, Siddiq S, Mehwish S, Islam A, Jafri L, et al. Plants as Antileishmanial Agents : Current Scenario. *Phyther Res*. 2016;1925: 1905–1925.
34. Rodrigues IA, Mazotto AM, Cardoso V, Alves RL, Amaral ACF, Rocha J, et al. Natural Products : Insights into Leishmaniasis Inflammatory Response. *Mediators Inflamm*. 2015;2015.
35. Polonio T, Efferth T. Leishmaniasis : Drug resistance and natural products (Review). *Int J Mol Med*. 2008; 277–286. doi:10.3892/ijmm
36. Kathuria M, Bhattacharjee A, Sashidhara K V, Singh P. Induction of Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in *Leishmania donovani* by Orally Active Clerodane Diterpene. 2014;58: 5916–5928. doi:10.1128/AAC.02459-14
37. Oliveira A, Prado B, Filho D. Copaiba Oil : An Alternative to Development of New Drugs against Leishmaniasis. 2012;2012. doi:10.1155/2012/898419
38. Duszenko M, Figarella K, Macleod ET, Welburn SC. Death of a trypanosome : a selfish altruism. 2006;22. doi:10.1016/j.pt.2006.08.010
39. Wide- W, Kinetics INT. APOPTOSIS : A BASIC BIOLOGICAL PHENOMENON WITH WIDE-. 1972;
40. Jiménez-ruiz A, Alzate JF, Macleod ET, Günter C, Lüder K, Fasel N, et al. Apoptotic markers in protozoan parasites. 2010; 1–15.
41. Circu ML, Aw TY. REACTIVE OXYGEN SPECIES, CELLULAR REDOX SYSTEMS AND APOPTOSIS. *Free Radic Biol Med*. 2010;48: 749–762. doi:10.1016/j.freeradbiomed.2009.12.022.REACTIVE
42. Mukherjee SB, Das M, Sudhandiran G, Shaha C. Increase in Cytosolic Ca²⁺ Levels through the Activation of Non-selective Cation Channels Induced by Oxidative Stress Causes Mitochondrial Depolarization Leading to Apoptosis-like Death in *Leishmania donovani* Promastigotes * Reactive oxygen species are important regulators of. 2002;277: 24717–24727. doi:10.1074/jbc.M201961200
43. Arambage SC, Grant KM, Pardo I, Ranford- L, Hurd H. Parasites & Vectors Malaria

ookinetes exhibit multiple markers for apoptosis-like programmed cell death in vitro.

2009;16: 1–16. doi:10.1186/1756-3305-2-32

44. Vargas FDS, Almeida PDO De, Aranha ESP. Biological Activities and Cytotoxicity of Diterpenes from *Copaifera* spp. Oleoresins. 2015; 6194–6210. doi:10.3390/molecules20046194
45. Pirttimaa M, Nasereddin A, Kopelyanskiy D, Kaiser M, Yli-kauhaluoma J, Brun R, et al. Abietane-Type Diterpenoid Amides with Highly Potent and Selective Activity against *Leishmania donovani* and *Trypanosoma cruzi*. 2015; doi:10.1021/acs.jnatprod.5b00990

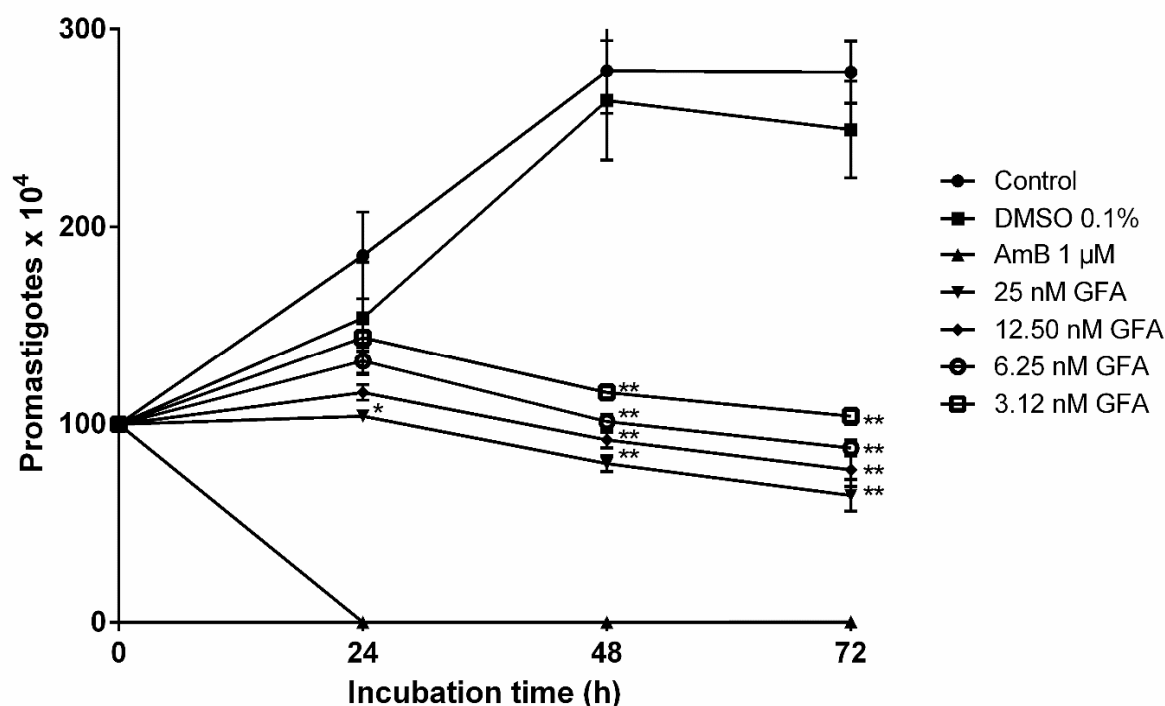


Figure 1: GFA (grandiflorenic acid) leishmanicidal activity. *L. amazonensis* promastigotes forms were subjected to different concentrations of GFA (3.12, 6.25, 12.50 and 25 nM), control (medium 199), DMSO 0.01% (diluent control), Amphotericin B - AmB 1 μM (positive control) and evaluated the parasite proliferation at 0, 24, 48 and 72 h. The values represent the mean \pm SEM of three independent experiments performed in duplicate. * Significant difference compared to control group ($p \leq 0.05$), ** ($p \leq 0.001$).

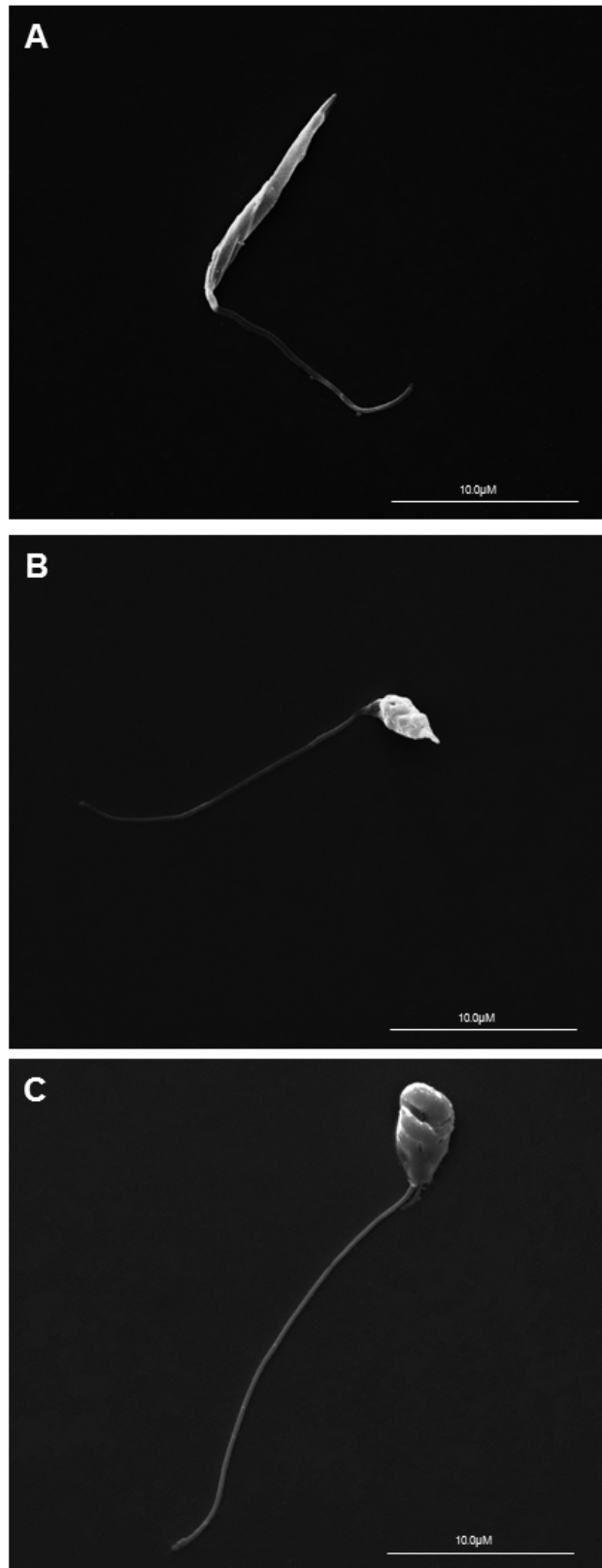


Figure 2: Scanning electron microscopy showing promastigotes forms of *L. amazonensis* treated with concentration of GFA by 24 h. (a) control; (b) and (c) treatment with 25 nM of GFA.

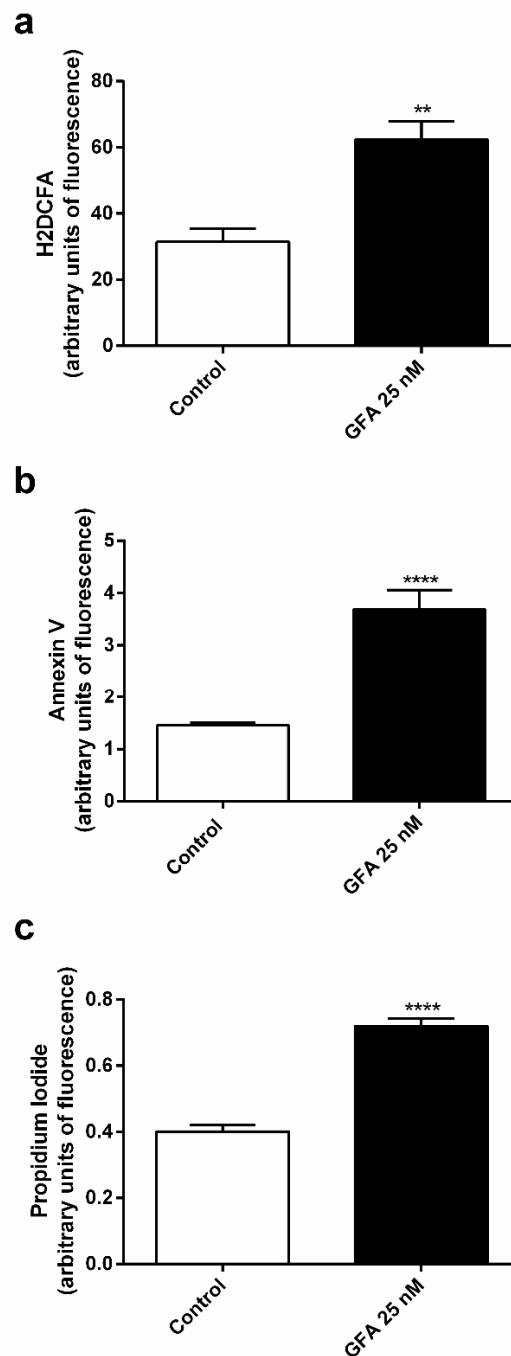


Figure 3: Death mechanism induced by GFA in *L. amazonensis* promastigote forms. *L. amazonensis*. Promastigote forms were treated for 24 h with 25 nM of GFA and evaluated to fluorimetric analysis of reactive oxygen species measurement through H2DCFDA probe (a), phosphatidylserine exposition by Annexin V labeling (b) and analyses of plasma membrane integrity by propidium iodide staining (c). Data represent the mean \pm SEM of three independent experiments performed in duplicate. ** Significant difference compared to control ($p \leq 0.001$), ****($p \leq 0.0001$).

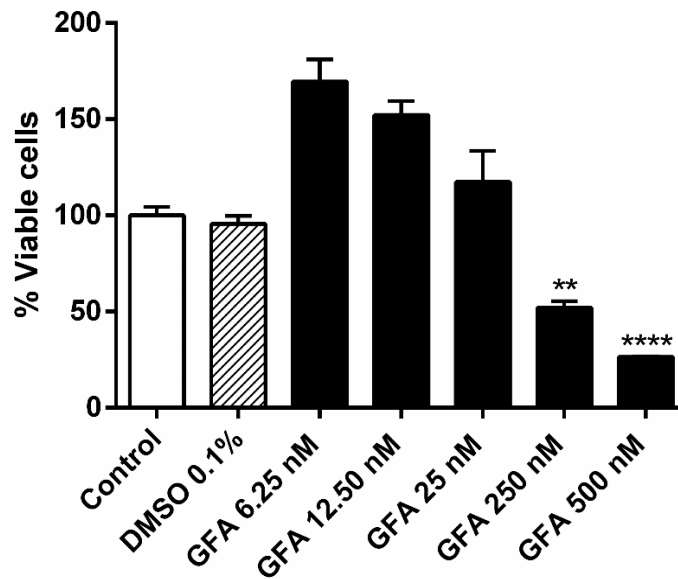


Figure 4: Viability of GFA treated macrophages. Peritoneal macrophages were treated with GFA at concentrations 6.25, 12.50, 25, 250 and 500 nM for 24 h and analyzed the viability by MTT assay. Negative control (medium RPMI) and DMSO 0.1% (diluent control). The values represent the mean \pm SEM of three independent experiments performed in duplicate. ** Significant difference compared to control ($p \leq 0.01$), ****($p < 0.0001$).

Table 1: Hemolytic activity of GFA on human erythrocytes.

Grandiflorencic acid	% hemolysis
500 nM	100 %
250 nM	100 %
25 nM	NH
12.50 nM	NH
6.25 nM	NH

NH: non-hemolysis.

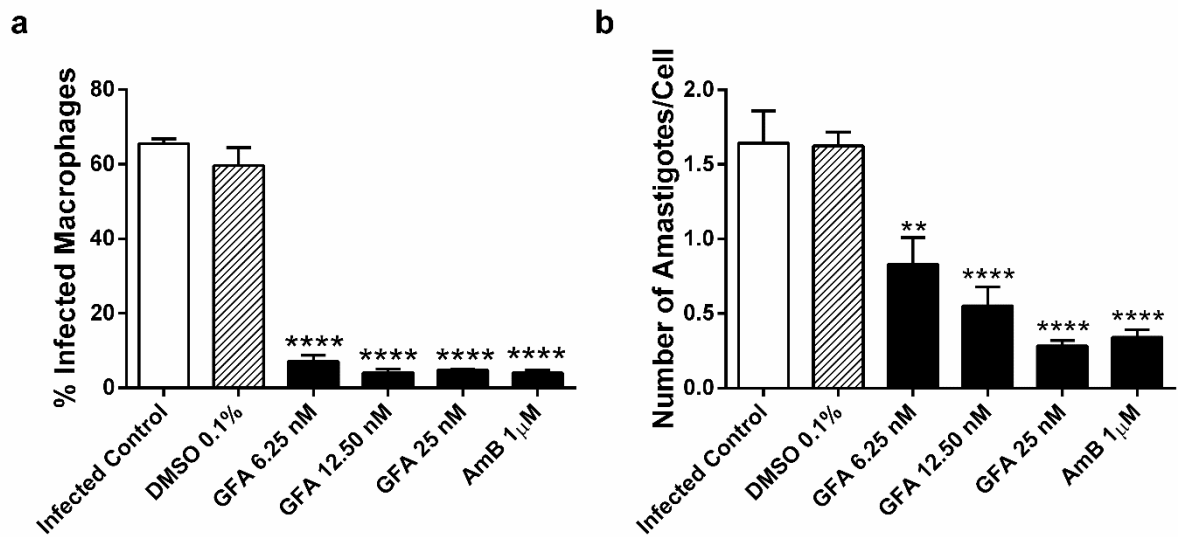


Figure 5: GFA effect on *L. amazonensis* infected macrophages. *L. amazonensis* infected macrophages were treated for 24 h with 6.25, 12.50, 25 nM of GFA and evaluated the percentage of infected macrophages (a) and number of amastigotes per macrophage (b). DMSO 0.1% (diluent control) and AmB 1 μ M (positive control). The values represent the mean \pm SEM of three independent experiments performed in duplicate. Significant difference compared to control ** ($p \leq 0.01$) **** ($p \leq 0.0001$).

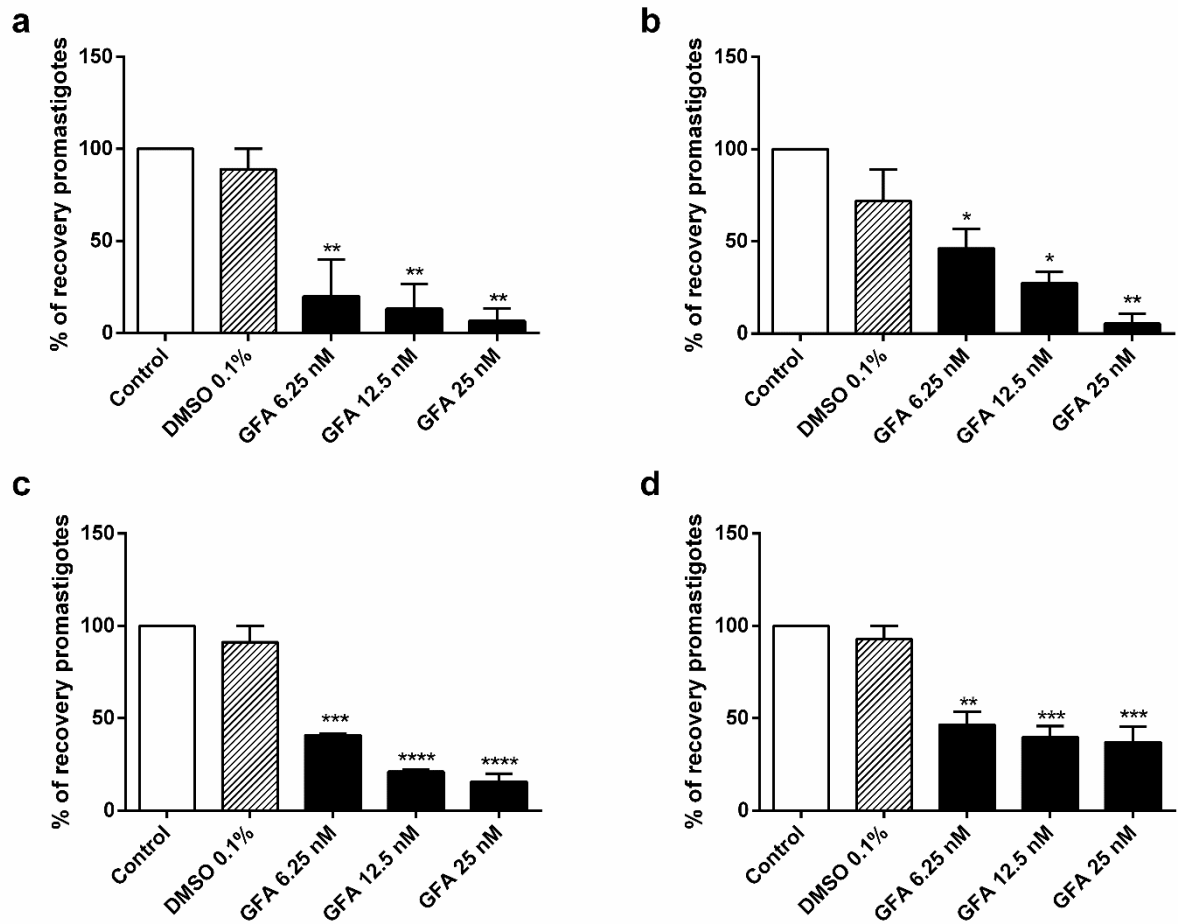


Figure 6: Recovery of promastigotes forms after GFA treatment. Infected macrophages with *L. amazonensis* were treated for 24 h with 6.25, 12.50 and 25 nM of GFA and subsequently incubated with medium 199 in B.O.D for 48h (a), 72 h (b), 96 h (c) and 120 h (d). Control (medium 199) and DMSO 0.1% (diluent control). The amount of recovered parasites was measured in Neubauer chamber daily. The values represent the mean \pm SEM of three independent experiments performed in duplicate. * Significant difference compared to control ($p < 0.05$), ** ($p \leq 0.01$), *** ($p \leq 0.0005$), **** ($p \leq 0.0001$).

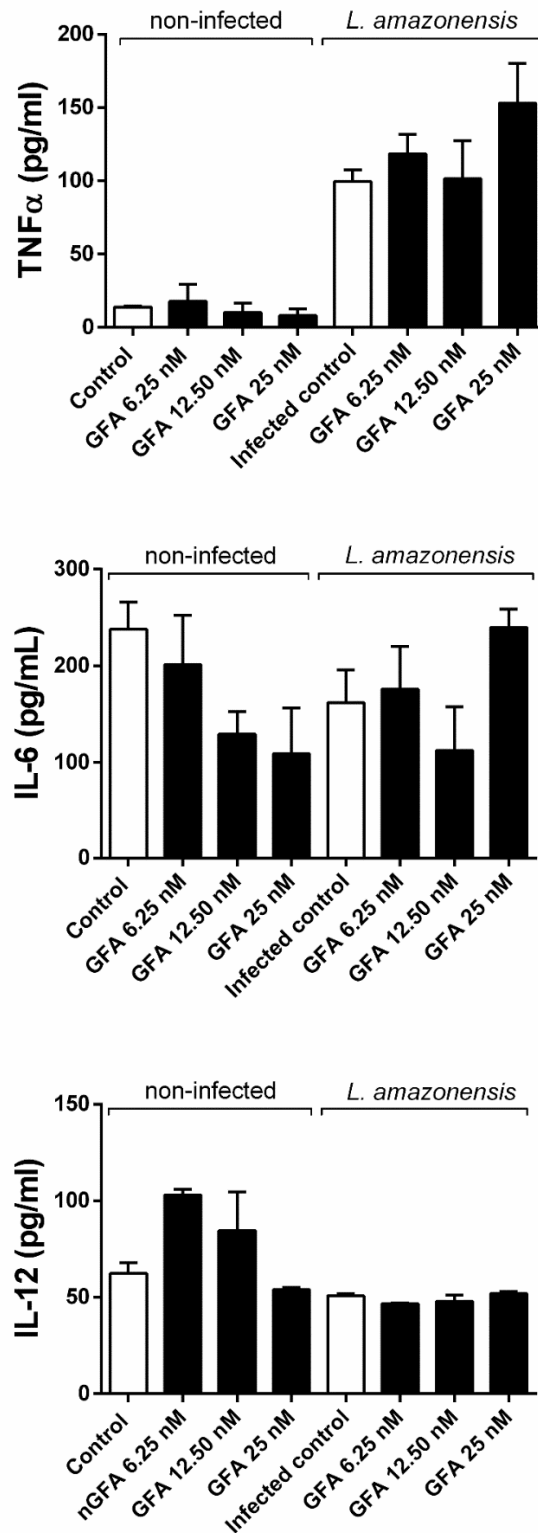


Figure 7: GFA immunomodulatory effect on *L. amazonensis* infected macrophages. TNF- α , IL-6 and IL-12 levels produced by *L. amazonensis* infected macrophages or uninfected macrophages treated with GFA at concentrations of 6.25, 12.50, 25 nM for 24h, determined by ELISA.

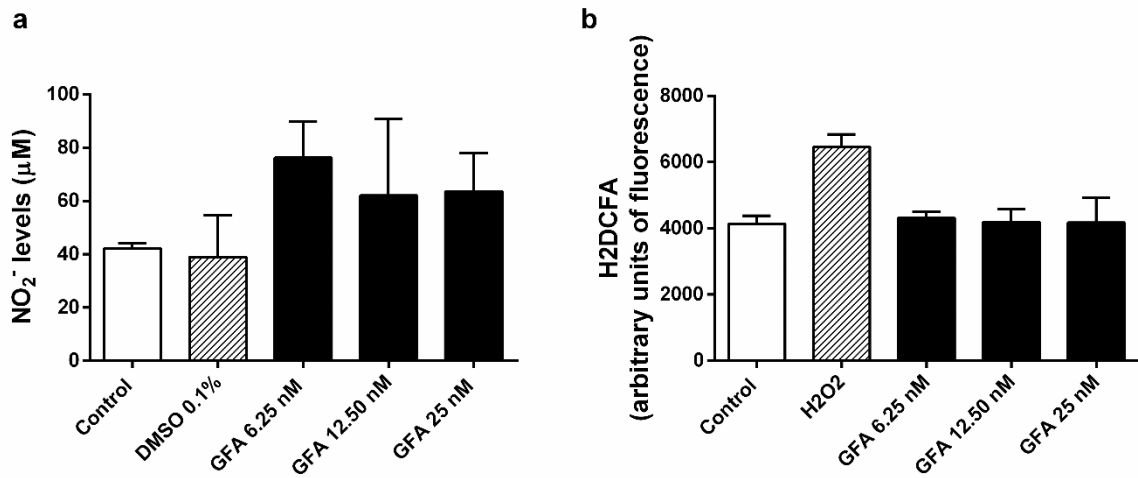


Figure 8: Intra-macrophage *L. amazonensis* death by GFA extracts is not dependent of NO and ROS.

The following methods were used to assess the *L. amazonensis*-infected macrophages submitted to a 24 h of treatment using the 6.25, 12.50, 25 nM GFA: a) Griess method for nitrite levels in culture supernatant and b) fluorescent probe H2DCFDA for reactive oxygen species measurement in culture cells. Control (medium RPMI), DMSO 0.1% (diluent control) and H₂O₂ (positive control). The values represent the mean ± SEM of three independent experiments performed in duplicate.

6 CONCLUSÃO

Através dos resultados obtidos, concluímos que:

- O ácido grandiflorênico (AG) apresenta atividade leishmanicida direta sobre formas promastigotas de *L. amazonensis* por induzir “apoptose-like”, pela produção de espécies reativas de oxigênio, exposição de fosfatidilserina e danos na membrana do parasito.
- AG causa alterações morfológicas como arredondamento, encurtamento do corpo e danos na membrana plasmática nas formas promastigotas de *L. amazonensis* como demonstrado pela microscopia eletrônica de varredura (MEV).
- AG não apresenta efeitos citotóxicos sobre macrófagos peritoneais e eritrócitos humanos nas concentrações de 6.25, 12.50 e 25 nM.
- AG apresenta atividade anti-amastigota, reduzindo o número de macrófagos infectados e o número de amastigotas, independente da produção de citocinas (TNF- α , IL-6 e IL-12), NO e ROS.

REFERÊNCIAS

- ABDELADHIM, M. et al. What's behind a sand fly bite? The profound effect of sand fly saliva on host hemostasis, inflammation and immunity. **HHS Public Access**, p. 691–703, 2015.
- AGRA, M. DE F. et al. Survey of medicinal plants used in the region Northeast of Brazil. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 18, n. August, p. 472–508, 2008.
- ANTOINE, J. C.; PRINA, E.; LANG, T. et al. The biogenesis and properties of the parasitophorous vacuoles that harbor *Leishmania* in murine macrophages. **Trends Microbiol.**, v. 7, n. 10, p. 392-401, 1998.
- ANTONIO, L. DE F. et al. Montenegro skin test and age of skin lesion as predictors of treatment failure in cutaneous leishmaniasis. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v. 56, n. 5, p. 375–380, 2014.
- ASSCHE, T. VAN et al. *Leishmania* – macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 2, p. 337–351, 2011.
- ASSIS, R. R. et al. Glycoinositolphospholipids from *Leishmania braziliensis* and *L. infantum*: Modulation of Innate Immune System and Variations in Carbohydrate Structure. **PLOS ONE Neglected Tropical Disease**, v. 6, n. 2, p. 1–11, 2012.
- BACCARIN, T. et al. Análise morfoanatômica das partes aéreas de *Wedelia paludosa* DC. (*Acmela brasiliensis*, *Sphagneticola trilobata*), Asteraceae. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. November 2008, p. 612–616, 2009.
- BALANÃ-FOUCE, R. et al. The Pharmacology of Leishmaniasis. **General Pharmacology**, v. 30, n. 4, p. 435–443, 1998.
- BALEKAR, N. et al. Wound healing activity of ent-kaura-9(11),16-dien-19-oic acid isolated from *Wedelia trilobata* (L.) leaves. **Phytomedicine**, v. 19, n. 13, p. 1178–1184, 2012.
- BANERJEE, A. et al. Role of pro-inflammatory cytokine IL-17 in *Leishmania* pathogenesis and in protective immunity by *Leishmania* vaccines. **Cellular Immunology**, v. 309, p. 37–41, 2016.
- BATISTA, R. et al. Cytotoxicity of *Wedelia paludosa* D.C. extracts and constituents. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 19, n. January, p. 36–40, 2009.
- BATISTA, R. et al. Synthesis and trypanocidal activity of ent-kaurane glycosides. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 15, p. 381–391, 2007.
- BATISTA, R. et al. Synthesis, cytotoxicity and antiplasmodial activity of novel ent - kaurane derivatives. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 62, p. 168–176, 2013.
- BATISTA, R.; BRAGA, F. C.; OLIVEIRA, A. B. Quantitative determination by HPLC of ent-kaurenoic and grandiflorenic acids in aerial parts of *Wedelia paludosa* D.C. **Brazilian Journal of Pharmacognosy**, v. 15, n. 2, p. 119–125, 2005.
- BATISTA, R.; DE OLIVEIRA, A.; CHIARI, E. Trypanosomicidal Kaurane Diterpenes from *Wedelia paludosa*. **Planta Medica**, v. 65, n. 03, p. 283-284, 1999.

- BELKAID, Y. et al. CD4⁺ CD25⁺ regulatory T cells control *Leishmania major* persistence and immunity. **Nature PublishingGroup**, v. 420, n. September, p. 633–637, 2002.
- BELKAID, Y.; BLANK, R. B.; SUFFIA, I. Natural regulatory T cells and parasites: a common quest for host homeostasis. **Immunological Reviews**, v. 212, p. 287–300, 2006.
- BELKAID, Y.; TARBELL, K. Regulatory T Cells in the Control of Host-Microorganism Interactions. **Annual Review of Immunology**, 2009.
- BLOCK, L. C. et al. Chemical and pharmacological examination of antinociceptive constituents of *Wedelia paludosa*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 61, p. 85–89, 1998.
- BOGDAN, C.; GESSNER, A.; et al. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. **Curr. Opin. Immunol.**, v. 8, p. 517–525, 1996.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Manual de recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a coinfeção leishmania-HIV / Ministério da Saúde, **Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis**. – 1. ed., rev. e ampl. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015. 109 p.: il.
- BRANDONISIO, O.; PANARO, M. A.; SISTO, M.; ACQUAFREDDA, A.; FUMAROLA, L.; LEOGRANDE, D.; MITOLO, V. Nitric oxide production by *Leishmania*-infected macrophages and modulation by cytokines and prostaglandins. **Parassitologia**. 43 Suppl 1:1-6, Dec. 2001.
- BRESCIANI, L. F. V.; CECHINEL-FILHO, V.; YUNES, R. A. Comparative Study of Different Parts of *Wedelia paludosa* by Gas Chromatography. **Natural Product Letters**, v. 14, p. 37–41, 2000.
- CALEGARI-SILVA, T. C. et al. NF-KB-mediated repression of iNOS expression in *Leishmania amazonensis* macrophage infection. **Immunology Letters**, v. 127, p. 19–26, 2009.
- CHIARI, E. et al. In vitro Screening of Asteraceae Plant Species Against *Trypanosoma cruzi*. **Phytotherapy Research**, v. 10, 1996.
- CHOI, R. J. et al. Inhibitory effects of kaurenoic acid from *Aralia continentalis* on LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages. **Phytomedicine**, v. 18, n. 8-9, p. 677–682, 2011.
- COSTA, F. B.; ALBUQUERQUE, S.; VICHNEWSKI, W. Diterpenes and Synthetic Derivatives from *Viguiera aspilioides* with Trypanocidal Activity. **Planta Med.** 62, v. 62, p. 557–559, 1996.
- CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 19, n. 1, p. 111–126, 2006.
- CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and molecular pathology**, v. 72, n. 2, p. 132–41, abr. 2002.
- CZUB, J.; BOROWSKI, E.; BAGINSKI, M. Interactions of amphotericin B derivatives with lipid membranes — A molecular dynamics study. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1768, p. 2616–2626, 2007.

DA SILVA, S. S. et al. Brazilian Propolis Antileishmanial and Immunomodulatory Effects. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013.

DOS SANTOS, A. O. et al. Antileishmanial activity of diterpene acids in copaiba oil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 108, n. February, p. 59–64, 2013.

ESCH, K. J.; PETERSEN, C. A. Transmission and Epidemiology of Zoonotic Protozoal Diseases of Companion Animals. **Clinical Microbiology Reviews**, v. 26, n. 1, p. 58–85, 2013.

FILHO, V. C. et al. Natural Product Research: Formerly Natural Product Letters
Paludolactone: A new Eudesmanolide Lactone from *Wedelia Paludosa* D.C. (*Acmela brasiliensis*). **Natural Product Research**, v. 18, n. May 2013, p. 37–41, 2004.

FLORA AVANCINE. *Wedelia paludosa* D.C. (Sphagneticola trilobata) (Asteraceae). Disponível em: <http://avancine.com.br/produto/wedelia/> Acesso em 12 de Janeiro de 2017.

GENARO, O. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: Neves DP, Melo AL, Linardi PM, Vitor RWA. **Parasitologia Humana**. 12^a ed. São Paulo: Atheneu, p.41-83, 2011

GLUENZ, E.; GINGER, M. L.; MCKEAN, P. G. Flagellum assembly and function during the *Leishmania* life cycle. **Current Opinion in Microbiology**, v. 13, n. 4, p. 473–479, 2010.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review of Anti-infective Therapy**, v. 7210, n. January, 2014.

HANDLER, M. Z. et al. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: Differential diagnosis, diagnosis, histopathology, and management. **Journal of American Dermatology**, v. 73, n. 6, p. 911–926, 2015.

HODIAMONT, C. J. et al. Species-Directed Therapy for Leishmaniasis in Returning Travellers: A Comprehensive Guide. **PLOS ONE Neglected Tropical Disease**, v. 8, n. 5, 2014.

HUESO-FALCÓN, I. et al. Synthesis and induction of apoptosis signaling pathway of ent-kaurane derivatives. **Bioorganic and Medicinal Chemistry**, v. 18, n. 4, p. 1724–1735, 2010.

ISNARD, A. et al. Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 2, n. May, p. 1–9, 2012.

JARA, M. et al. Real-Time PCR Assay for Detection and Quantification of *Leishmania (Viannia)* Organisms in Skin and Mucosal Lesions: Exploratory Study. **Journal of Clinical Microbiology**, v. 51, n. 6, p. 1826–1833, 2013.

JI, J. et al. CD4⁺ CD25⁺ Regulatory T Cells Restrain Pathogenic Responses during *Leishmania amazonensis* Infection. **Journal Immunology**, v. 174, n. 11, p. 7147–7153, 2005.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host – pathogen interface. **Nature Publishing Group**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.

KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today? **Journal of Global Infectious Diseases**, n. 2, p. 177–186, 2010.

KOPTERIDES, P. et al. Aspects of the association between leishmaniasis and malignant disorders. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, 2007.

KOSTKA, S. L. et al. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. **Journal Immunology**, v. 182, n. 5, p. 3039–3046, 2009.

LAGES, C. S. et al. Functional Regulatory T Cells Accumulate in Aged Hosts and Promote Chronic Infectious Disease Reactivation. **Journal Immunology**, v. 181, n. 3, p. 1835–1848, 2008.

LASKAY, T.; ZANDBERGEN, G. VAN; SOLBACH, W. Neutrophil granulocytes – Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes? **TRENDS in Microbiology**, v. 11, n. 5, p. 210–214, 2003.

LAULETTA, J. A.; CUNHA, M. A.; QUEIROZ, I. T. Leishmaniasis – HIV co infection: current challenges. HIV/AIDS - **Research and Palliative Care**. p. 147–156, 2016.

LAUNOIS, P.; SWIHART, K.; CONCEICAO-SILVA, F.; MILON, G.; LOUIS, J.A. T-cell responses elicited by *Leishmania major* in mice. In: Molecular and Immune mechanisms in the pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. **Eds. Tapia, F.J.; Caceres-Dittmar, G. & Sanches, M.A.**, 4032-4039, 1996.

LERNER, E. A.; LUGA, A. O.; REDDY V. B. Maxadilan, a PAC1 receptor agonist from sand flies. **Peptides**. 1651-4. Epub 2007 Jun 28. Sep;28(9):1651-4. 2007

LIM, H. et al. Anti-inflammatory Activity of the Constituents of the Roots of *Aralia continentalis*. v. 32, n. 9, p. 1237–1243, 2009.

LINCOPAN, N.; MAMIZUKA, E. M.; CARMONA-RIBEIRO, A. M. Low nephrotoxicity of an effective amphotericin B formulation with cationic bilayer fragments. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, n. March, p. 727–734, 2005.

LONARDONI, M. V.; SILVEIRA, T. G.; ALVES, W. A.; MAIA-ELKHOURY, A. N.; MEMBRIVE, U. A.; MEMBRIVE, N. A.; RODRIGUES, G.; REIS, N.; ZANZARINI, P. D.; ISHIKAWA, E.; TEODORO, U. Human and canine American cutaneous leishmaniasis in Mariluz, Parana State, Brazil. **Cad Saude Publica**. 22(12), 2713-2716, 2006.

MACRI, J. A. et al. Immunomodulatory and Antioxidant properties of Kaurenoic acid on macrophages of BALB/c in Vitro. **American Journal of Immunology**, v. 10, n. 4, p. 183–188, 2014.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual Anual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília - DF: Editora do Ministério da Saúde, p. 182. 2 ed. 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília - DF: Editora do Ministério da Saúde, p. 120. 1 ed. 2006.

MIRANDA, M. M. et al. Kaurenoic Acid Possesses Leishmanicidal Activity by Triggering a NLRP12/IL-1B/cNOS/NO Pathway. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.

MIZOKAMI, S. S. et al. Kaurenoic Acid from *Sphagneticola trilobata* Inhibits Inflammatory Pain: Effect on Cytokine Production and Activation of the NO-Cyclic GMP-Protein Kinase G-ATP-Sensitive Potassium Channel Signaling Pathway. **Journal of Natural Products**, 2012.

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

MORRIS, R. V. et al. Sandfly Maxadilan Exacerbates Infection with *Leishmania major* and Vaccinating Against It Protects Against *L. major* Infection. **The Journal of Immunology**, 2001.

MOSMANN, T. Rapid Colorimetric Assay for Cellular Growth and Survival: Application to Proliferation and Cytotoxicity Assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55–63, 1983.

NATERA, S. et al. *Leishmania* spp: proficiency of drug-resistant parasites. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 29, p. 637–642, 2007.

OLIVEIRA, L. F. et al. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica**, v. 118, n. 2, p. 87–96, 2011.

PEREIRA, B. A. S.; ALVES, C. R. Immunological characteristics of experimental murine infection with *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Veterinary Parasitology**, v. 158, n. 4, p. 239–255, 20 dez. 2008.

PETERS, N. C. et al. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in Leishmaniasis transmitted by sand flies. **NIH Public Access**, v. 321, n. 5891, p. 970–974, 2009.

PETERS, N. C.; EGEN, J. G.; SECUNDINO, N.; DEBRABANT, A.; KIMBLIN, N.; KAMHAWI, S.; LAWYER, P.; FAY, M. P.; GERMAIN, R. N.; SACKS, D. In vivo imaging reveals an essential role for neutrophils in leishmaniasis transmitted by sand flies. **Science** 321, 970-973, 2008.

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

READY, P. D. Biology of Phlebotomine Sand Flies as Vectors of Disease Agents Annu. **Rev. Entomol.** 2013. 58:227–50

RIBEIRO, J. M. C.; FRANCISCHETTI I. M. V. Role of Arthropod Saliva in Blood Feeding: Sialome and Post-Sialome Perspectives. **Annu Rev Entomol** 48: 73-88, 2003.

RIBEIRO, J. M. C.; MODI, G. B.; TESH, R. B. Salivary Apyrase Activity Of Some Old World. **Insect Biochem.**, v. 19, n. 4, p. 1–4, 1989.

RIBEIRO, J. M. C.; ROSSIGNOL, P. A.; SPIELMAN, A. Blood-Finding Strategy Of A Capillary-Feeding Sandfly, *Lutzomyia longipalpis*. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 83, n. 4, p. 683–686, 1986.

ROCHA, L. G. et al. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, v. 12, p. 514–535, 2005.

ROGERS, K. A.; TITUS, R. G. Immunomodulatory effects of Maxadilan and Phlebotomus papatasi sand fly salivary gland lysates on human primary in vitro immune responses. **Parasite Immunology**, v. 25, n. April, p. 127–134, 2003.

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. THE IMMUNOLOGY OF SUSCEPTIBILITY AND RESISTANCE. **Nature Publishing Group**, v. 2, n. November, 2002.

SARTORI, M. R. K. et al. Antifungal activity of fractions and two pure compounds of flowers from Wedelia paludosa (Acmela brasiliensis) (Asteraceae). **Pharmazie**, p. 567–569, 2003.

SCAPINI, P. J.; LAPINET-VERA, A.; GASPERINI, S. The neutrophil as a cellular source of chemokines. **Immunol Rev.** 177, 195–203, 2000.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Publishing Group**, 2016.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Publishing Group**, 2016.

SILVEIRA, F. T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**, v. 31, n. 8, p. 423–431, ago. 2009.

SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO (Brasil). LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA - **Casos confirmados Notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net**. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/ltaPR.def> Acesso em: 06 dez 2015

SOMOVA, L. I. et al. Cardiovascular and diuretic activity of kaurene derivatives of *Xylopia aethiopica* and *Alepidea amatymbica*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 77, p. 165–174, 2001.

SOONG, L. et al. Role of CD4+ T cells in pathogenesis associated with *Leishmania amazonensis* infection. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 158, n. 11, p. 5374–83, 1 jun. 1997.

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. **Informa Health Care**, p. 1–16, 2015.

TIRAPELLI, C. R. et al. Analysis of the mechanisms underlying the vasorelaxant action of kaurenoic acid in the isolated rat aorta. **European Journal of Pharmacology**, v. 492, p. 233–241, 2004.

TIRAPELLI, C. R. et al. Hypotensive action of naturally occurring diterpenes: A therapeutic promise for the treatment of hypertension. **Fitoterapia**, v. 81, n. 7, p. 690–702, 2010.

TIUMAN, T. S. et al. Recent advances in leishmaniasis treatment. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 15, 2011.

UENO, N.; WILSON, M. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. **Trends in Parasitol.**, v. 28, n. 8, p. 335–344, 2012.

ULLAH, N. et al. Plants as Antileishmanial Agents : Current Scenario. **Phytotherapy Research**, v. 1925, n. August, p. 1905–1925, 2016.

WHO/DEPARTMENT OF CONTROL OF NEGLECTED TROPICAL DISEASES.
Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. **Weekly epidemiological record**, n. 22, p. 285–296, 2016.

WILKENS, M. et al. Characterization of the Bactericidal Activity of the Natural Diterpene Kaurenoic Acid. **Planta Medica**, p. 3–5, 2002.

WINBERG, M. E. et al. Leishmania donovani lipophosphoglycan inhibits phagosomal maturation via action on membrane rafts. **Microbes and Infection**, v. 11, p. 215–222, 2009.

ANEXOS

COMITÊ DE ÉTICA EM EXPERIMENTAÇÃO ANIMAL



UNIVERSIDADE
ESTADUAL DE LONDRINA

COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA Nº 162/2016

Londrina, 01 de Agosto de 2016.

Prezado Pesquisador,

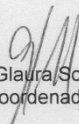
Certificamos que o projeto intitulado "**Investigação do potencial leishmanicida e imunomodulador de diferentes compostos: *Caryocar coriaceum*, *Ricinus communis*, ácido grandiflorêncio e trans-chalcona na leishmaniose experimental**", protocolo CEUA nº 13134.2016.62, sob a responsabilidade de **Wander Rogério Pavanelli**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi **aprovado** pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Universidade Estadual de Londrina (CEUA/UEL), em reunião realizada em **26/07/2016**.

O objetivo do projeto é avaliar a capacidade leishmanicida e imunomoduladora dos diferentes compostos *Caryocar coriaceum* (extratos acetílico, etanólico, hexanólico e metanólico), *Ricinus communis* (extrato etanólico), ácido grandiflorênico (isolado da *Wedelia paludosa*) e trans-chalcona, na leishmaniose experimental *in vitro*. Os camundongos serão mantidos no Biotério do Departamento de Ciências Patológicas da Universidade Estadual de Londrina com temperatura (em torno de 22±2°C) e luminosidade controlada seguindo o ciclo claro/escuro (12/12 h). Serão mantidos em caixa de polietileno com livre acesso a água filtrada e ração comercial ad libitum autoclavada. Ao término dos experimentos os animais serão eutanasiados por inalação de isoflurano (3% em O₂) seguido de decaptação. Gl 1.

Vigência do Projeto	24/08/2016 a 24/07/2017
Espécie/linhagem	Camundongo isogênico / BALB/c
Nº de animais	50
Peso/Idade	25 g / 6 a 8 semanas
Sexo	Machos e Fêmeas
Origem	Biotério Fiocruz/Curitiba
Amostras a serem coletadas	Macrófagos peritoneis

Cumpra orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo experimental aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações.

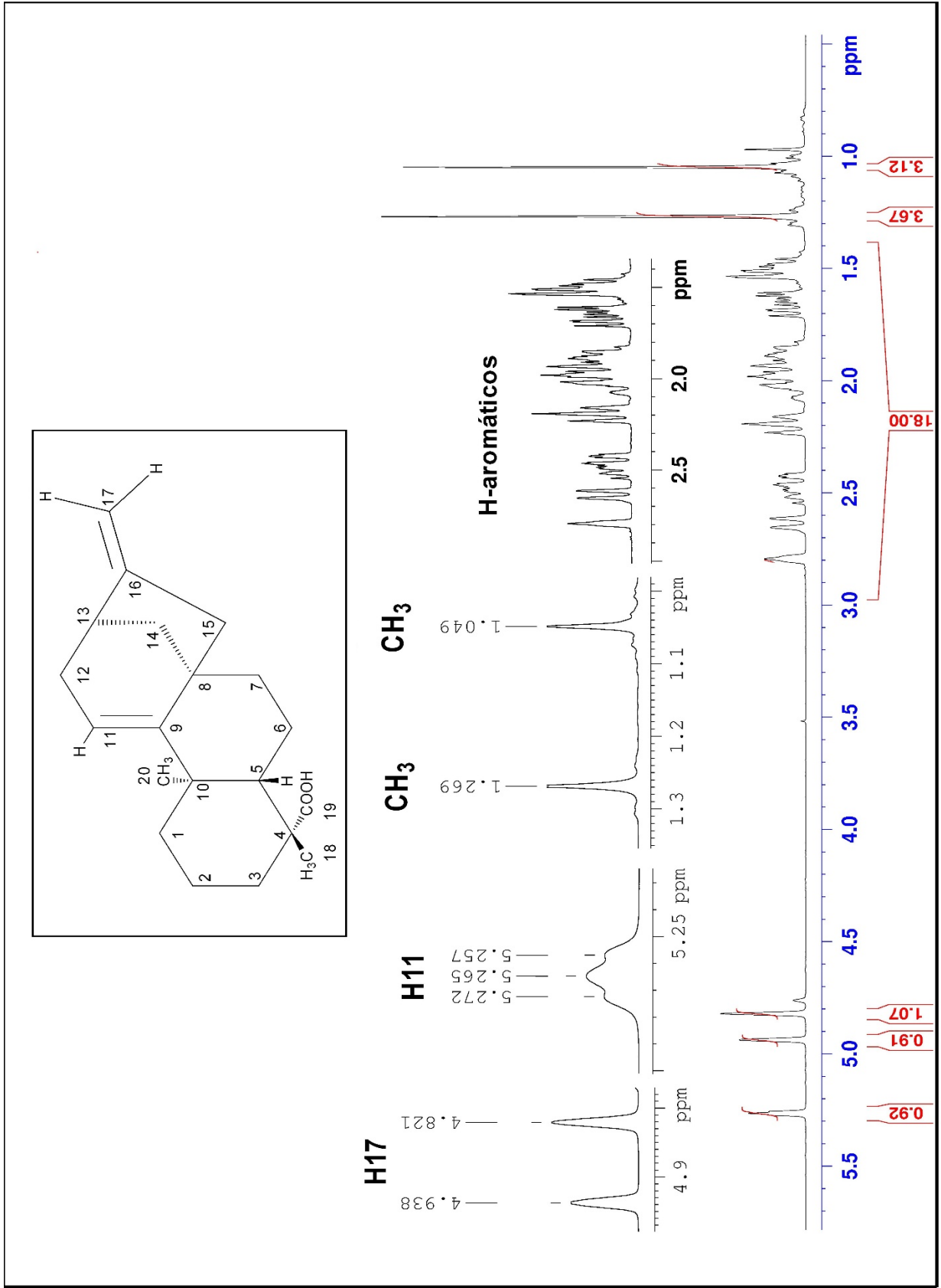
Coloco-me à disposição para quaisquer esclarecimentos que se fizerem necessária. Sem mais para o momento, subscrevo, cordialmente,


 Profa. Dra. Glaura Scantamburlo Alves Fernandes
 Coordenadora da CEUA/UEL

Ilmo. Sr.
Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli
 Coordenador do Projeto
 Departamento de Ciências Patológicas / Centro de Ciências Biológicas
 Com cópia para Chefe do Departamento de Ciências Patológicas e Diretor(a) do Centro de Ciências Biológicas

Campus Universitário: Rodovia Celso Garcia Cid (PR 445), km 380 - Fone (043) 3371-4000 PABX - Fax 3328-4440 - Caixa Postal 10.011 - CEP 86057-970 - Internet <http://www.uel.br>
 LONDRINA - PARANÁ - BRASIL

ESPECTRO DE RMN DE ¹H



ESPECTRO DE RMN DE ^{13}C 