



UNIVERSIDADE  
ESTADUAL DE LONDRINA

---

ALLAN HENRIQUE DEPIERI CATANEO

**EFEITOS DO FLAVONÓIDE QUERCETINA NA INFECÇÃO *IN*  
*VITRO* POR *Leishmania (Viannia) braziliensis***

ALLAN HENRIQUE DEPIERI CATANEO

**EFEITOS DO FLAVONÓIDE QUERCETINA NA INFECÇÃO *IN VITRO* POR *Leishmania (Viannia) braziliensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental.

Orientador: Prof. Dr. Wander Rogério Pavanelli  
Co-orientadora: Profa. Dra. Ivete Conchon Costa

Londrina  
2016

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

Cataneo, Allan Henrique Depieri.

Efeitos do flavonóide quercetina na infecção in vitro por *Leishmania (Viannia) braziliensis* / Allan Henrique Depieri Cataneo. - Londrina, 2016.  
73 f. : il.

Orientador: Wander Rogério Pavanelli.

Coorientador: Ivete Conchon-Costa.

Dissertação (Mestrado em Patologia Experimental) - Universidade Estadual de Londrina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental, 2016.

Inclui bibliografia.

1. Leishmaniose - Tese. 2. Quercetina - Tese. 3. macrófago - Tese. I. Pavanelli, Wander Rogério . II. Conchon-Costa, Ivete. III. Universidade Estadual de Londrina. Centro de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental. IV. Título.

ALLAN HENRIQUE DEPIERI CATANEO

**EFEITOS DO FLAVONÓIDE QUERCETINA NA INFECÇÃO *IN VITRO*  
POR *Leishmania (Viannia) braziliensis***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina, como requisito para a obtenção do título de Mestre em Patologia Experimental

**BANCA EXAMINADORA**

---

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

---

Dr<sup>a</sup>. Priscilla Fanini Wowk  
Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ/PR

---

Prof. Dr. Phileo Pinge Filho  
Universidade Estadual de Londrina – UEL

Londrina, 26 de fevereiro de 2016.

Dedico este trabalho a todos os colegas pesquisadores que lutam diariamente  
para multiplicar o conhecimento e construir um mundo melhor

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus, o maior mestre que alguém pode conhecer, por me conduzir ao longo da minha vida, sempre me guiando pelo caminho da Sua vontade.

À orientação do Dr. Wander R. Pavanelli e coorientação da Dra. Ivete Conchon Costa e pelo suporte, apoio, correções, incentivo e inspiração.

Aos professores do programa de Pós Graduação em Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina por todo conhecimento compartilhado.

À professora Dra. Carolina Panis, da Universidade Estadual do Oeste do Paraná, por todas as discussões científicas, aprendizado e grande incentivo em todo tempo, responsável direta por aflorar a paixão pela ciência nos alunos.

Ao pesquisador Dr. Juliano Bordignon pela colaboração em todos os projetos de pesquisa do nosso grupo.

À banca examinadora composta pela Dr<sup>a</sup>. Priscilla F. Wowk e pelo Prof. Dr Phileno P. Filho pelas ricas discussões científicas, parcerias e dedicada correção.

Agradeço a minha mãe Marcia, pelo apoio incondicional e pelo incentivo nas horas difíceis, de desânimo e cansaço.

Agradeço ao meu Pai Eduardo por todo o suporte nesses anos, por acreditar em mim e me encorajar sempre.

Agradeço à minha noiva Keyla, que em todos os momentos me fez enxergar as coisas melhores do que elas são e esteve ao meu lado incondicionalmente, suportando dias de estresse, ansiedade, e nunca deixando de oferecer uma palavra abençoada para me acalmar.

Meus agradecimentos aos amigos Fernanda, Milena, Pedro, Tatiane, Ana Paula, Natália, Suelen, Jacqueline e Bruna, companheiros de trabalho que tornam o dia a dia mais agradável, fizeram parte da minha formação e vão continuar presentes em minha vida.

Agradeço a todos os professores que com grande sabedoria souberam me direcionar, não apenas no conhecimento, mas na formação do meu caráter, não só por me ensinarem a ser profissional, mas por terem me feito mais humano. Chamá-los de mestre não fará justiça aos professores tão dedicados que sem nominar terão os meus eternos agradecimentos.

Agradeço também ao departamento de Patologia Experimental da Universidade Estadual de Londrina.

A esta instituição, seu corpo docente, direção, administração que me deram a oportunidade de ampliar os horizontes.

*“A sabedoria faz a força do homem; e o conhecimento lhe dá poder. A estratégia é a chave para a guerra, assim como bons conselhos são a chave para a vitória”*

**Provérbios 24:3-4**

*“Um pouco de ciência nos afasta de Deus. Muito, nos aproxima”*

**Louis Pasteur**

1 CATANEO, Allan Henrique Depieri. **Efeitos *in vitro* do flavonóide quercetina na**  
2 **infecção *in vitro* por *Leishmania (Viannia) braziliensis***. 2016. 73 f. Dissertação  
3 (Mestrado em Patologia Experimental) – Universidade Estadual de Londrina,  
4 Londrina, 2016.

5  
6  
7 **RESUMO**  
8  
9

10 A Leishmaniose Tegumentar Americana é uma doença de caráter zoonótico  
11 causada por protozoários do gênero *Leishmania* e tem como característica principal  
12 a formação de lesões indolores e ulceradas com bordas de cor vermelha intensa. O  
13 tratamento da leishmaniose tegumentar é altamente tóxico ao hospedeiro e  
14 apresenta diversas limitações, esse cenário impulsiona a busca por novas  
15 estratégias terapêuticas. Dessa maneira, o presente trabalho teve como objetivo  
16 avaliar, *in vitro*, o efeito do flavonóide quercetina na infecção por *Leishmania Viannia*  
17 *braziliensis*. A fim de alcançar os objetivos foi avaliado o efeito antipromastigota da  
18 quercetina sobre *Leishmania (Viannia) braziliensis* e ensaio fagocítico, além disso,  
19 avaliou-se a produção de citocinas, óxido nítrico, expressão de NRF-2, iNOS e os  
20 níveis de ferro livre. O tratamento com quercetina foi capaz de inibir a proliferação  
21 das formas promastigotas em todas as concentrações testadas, reduzir o número de  
22 macrófagos parasitados e favorecer a morte de amastigotas intracelulares. Nossos  
23 resultados demonstram que a quercetina não foi capaz de modular o perfil de  
24 citocinas e óxido nítrico, sugerindo que o mecanismo envolvido na eliminação de *L.*  
25 *braziliensis* não é dependente de óxido nítrico e citocinas nesse modelo. Os dados  
26 indicam que o provável mecanismo pelo qual a quercetina exerce seu efeito  
27 leishmanicida é devido a sua capacidade de ativar respostas antioxidantes, seguido  
28 da modulação de ferro, culminando na deprivação do ferro disponível para a  
29 replicação do parasito.

30  
31 **Palavras-chave:** Macrófago. Quercetina. Leishmaniose. Ferro.

1 CATANEO, Allan Henrique Depieri. *In vitro* effects of flavonoid quercetin in *in*  
2 *vitro* infection by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. 2016. 73 p. Dissertation  
3 (Master's degree in Experimental Pathology) – Universidade Estadual de Londrina,  
4 Londrina, 2016.

5  
6  
7 **ABSTRACT**  
8  
9

10 American Cutaneous Leishmaniasis is a zoonotic disease caused by the protozoa of  
11 the genus *Leishmania*, and has as main characteristic the formation of painless  
12 ulcerated lesions with intense red color borders. The treatment of cutaneous  
13 leishmaniasis is highly toxic to the host and presents several limitations, this scenario  
14 favors the search for new therapeutic strategies. In this way, the present work aimed  
15 to evaluate *in vitro* the effect of the flavonoid Quercetin in *Leishmania Viannia*  
16 *braziliensis* infection. In order for reaching this, was performed an antipromastigote  
17 assay assay on *Leishmania (Viannia) braziliensis* and phagocytic assay, furthermore,  
18 we evaluated cytokines and nitric oxide production, NRF-2, iNOS expression and free  
19 iron pool. Treatment with quercetin was able to inhibit the proliferation of  
20 promastigote forms in all concentrations tested, decrease the number of parasitized  
21 macrophages and promote the death of intracellular amastigotes. Our results showed  
22 that quercetin was not able to modulate the cytokines and nitric oxide profile,  
23 suggesting that the mechanism involved in *L. braziliensis* elimination is not cytokine  
24 and NO-dependent in this model. Our data indicated that the probable mechanism by  
25 which quercetin exerts its antileishmanial effects is due to its capacity of activating  
26 antioxidant responses, followed by a modulation of free iron pool, which culminates in  
27 a deprivation of available iron to the parasite.

28  
29 **Key words:** Macrophage. Quercetin. Leishmaniasis. Iron.  
30  
31  
32  
33  
34  
35  
36  
37  
38  
39  
40  
41  
42  
43  
44  
45  
46  
47  
48  
49  
50

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

1		
2		
3	Figura 1 – Situação da endemicidade de Leishmaniose Visceral no mundo em	
4	2013 .....	14
5	Figura 2 – Situação da endemicidade de Leishmaniose cutânea no mundo em	
6	2013.....	15
7	Figura 3 – Classificação do gênero, subgênero e espécies do complexo	
8	<i>Leishmania</i> .....	17
9	Figura 4 – Ciclo biológico de <i>Leishmania</i> spp .....	18
10		
11		
12		
13		
14		
15		
16		
17		
18		
19		
20		
21		
22		
23		
24		
25		
26		
27		
28		
29		
30		
31		
32		
33		
34		
35		
36		
37		
38		
39		
40		
41		
42		
43		
44		
45		

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

1		
2		
3	BALB/c	Linhagem de camundongos isogênicos
4	C57BL/6	Linhagem de camundongos isogênicos
5	DNA	Ácido desoxiribonucleico
6	GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
7	IFN- $\gamma$	Interferon gamma
8	IL-1 $\beta$	Interleucina – 1 beta
9	IL-2	Interleucina – 2
10	IL-4	Interleucina – 4
11	IL-6	Interleucina – 6
12	IL-8	Interleucina – 8
13	IL-10	Interleucina – 10
14	IL-13	Interleucina – 13
15	iNOS	Óxido nítrico sintase induzida
16	LC	Leishmaniose cutânea
17	LPG	Lipofosfoglicano
18	LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
19	LV	Leishmaniose visceral
20	NADPH	Nicotinamida adenina dinucleotídeo fosfato
21	NF-K $\beta$	Fator nuclear Kappa B
22	NO	Óxido Nítrico
23	NRF-2	Fator nuclear derivado de eritróide 2
24	OMS	Organização Mundial da Saúde
25	PBMCs	Células Mononucleares de Sangue Periférico
26	T-bet	Fator nuclear de transcrição para diferenciação em células Th1
27	Th-1	'T <i>helper</i> 1'
28	Th-2	'T <i>helper</i> 2'
29	TNF- $\alpha$	Fator de Necrose Tumoral
30		
31		
32		
33		
34		
35		

## SUMÁRIO

1			
2			
3	<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	13
4	<b>1.1</b>	<b>Leishmanioses</b> .....	13
5	<b>1.2</b>	<b>Agente etiológico e ciclo biológico</b> .....	16
6	<b>1.3</b>	<b>Interação parasito-hospedeiro e resposta imunológica na LTA</b> .....	19
7	<b>1.4</b>	<b>Tratamento</b> .....	22
8	<b>1.5</b>	<b>Quercetina</b> .....	25
9			
10	<b>2</b>	<b>REFERÊNCIAS</b> .....	28
11			
12	<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	36
13	<b>3.1</b>	<b>Objetivo Geral</b> .....	36
14	<b>3.2</b>	<b>Objetivos específicos</b> .....	36
15			
16	<b>4</b>	<b>PRODUÇÃO CIENTÍFICA</b> .....	37
17	<b>4.1</b>	<b>Artigo: Quercetin modulates Leishmania (Viannia) braziliensis</b>	
18		<b>infection in vitro by upregulating NRF2 expression and affecting</b>	
19		<b>iron availability</b> .....	37
20		<b>Abstract</b> .....	39
21	<b>1</b>	<b>Introduction</b> .....	40
22	<b>2</b>	<b>Material and Methods</b> .....	42
23	<b>2.1</b>	<b><i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i> culture</b> .....	42
24	<b>2.2</b>	<b>Quercetin</b> .....	43
25	<b>2.3</b>	<b>Animals and Ethics Statement</b> .....	43
26	<b>2.4</b>	<b>Evaluation of antipromastigote effect</b> .....	43
27	<b>2.5</b>	<b>Viability of peritoneal macrophages</b> .....	44
28	<b>2.6</b>	<b>Phagocytic assays</b> .....	44
29	<b>2.7</b>	<b>Promastigote recovery assay</b> .....	45
30	<b>2.8</b>	<b>Cytokine determination</b> .....	45
31	<b>2.9</b>	<b>Determination of nitrite levels as estimation of nitric oxide (NO)</b> .....	45
32	<b>2.10</b>	<b>Determination of labile iron concentration and total bound Iron</b> .....	46
33	<b>2.11</b>	<b>Immunocytochemical assays</b> .....	47
34	<b>2.12</b>	<b>Statistical Analysis</b> .....	48

1	<b>3</b>	<b>Results</b> .....	48
2	<b>3.1</b>	<b>Quercetin inhibited growth of <i>L. braziliensis</i> promastigote forms</b> .....	48
3	<b>3.2</b>	<b>Phagocytic index was reduced, as well the number of amastigotes</b>	
4		<b>per macrophage and recovered promastigotes</b> .....	49
5	<b>3.3</b>	<b>Quercetin treatment did not modulate cytokines, iNOS and NO</b>	
6		<b>levels</b> .....	50
7	<b>3.4</b>	<b>Labile iron concentration was decreased and iron bound to</b>	
8		<b>transferrin increased</b> .....	51
9	<b>3.5</b>	<b>Quercetin Upregulated nuclear factor erythroid 2-related factor</b>	
10		<b>(NRF2) expression</b> .....	51
11	<b>4</b>	<b>Discussion</b> .....	51
12	<b>5</b>	<b>Acknowledgments</b> .....	55
13	<b>6</b>	<b>Conflict of interest</b> .....	56
14	<b>7</b>	<b>References</b> .....	56
15	<b>8</b>	<b>Figure Legends</b> .....	66
16	<b>9</b>	<b>Figures</b> .....	68
17			
18	<b>5</b>	<b>ANEXOS</b> .....	73
19	<b>5.2</b>	<b>ANEXO 1 – Aprovação do Comitê de Ética</b> .....	73
20			
21			
22			
23			
24			
25			
26			
27			
28			
29			
30			
31			
32			
33			
34			
35			

## **1. INTRODUÇÃO**

### **1.1. Leishmanioses**

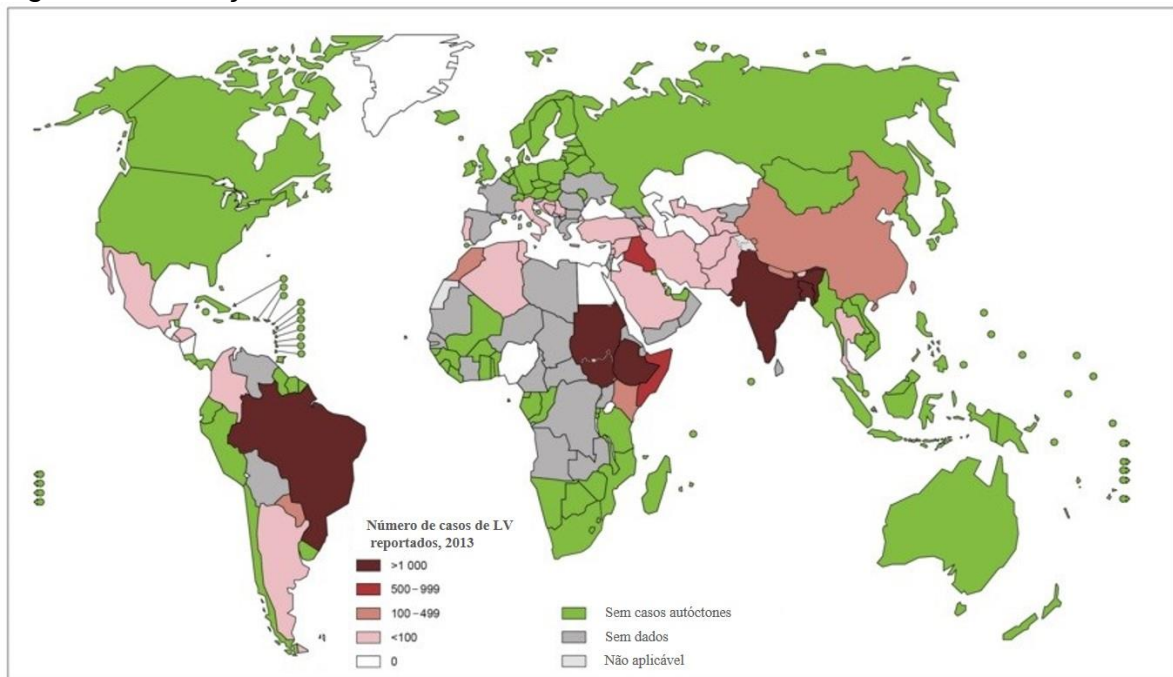
As leishmanioses são doenças infecto-parasitárias que acometem o homem e outros mamíferos. A doença pode apresentar diferentes formas clínicas dependendo da espécie do parasito envolvida e da resposta imunológica do hospedeiro, sendo as duas principais a leishmaniose visceral (LV) e a leishmaniose tegumentar americana (LTA) (GONTIJO; CARVALHO, 2003; VON STEBUT, 2015).

De acordo com Mears e colaboradores (2015), a forma cutânea é caracterizada pela formação de úlceras únicas ou múltiplas na derme com a epiderme ulcerada, resultando em úlceras leishmanióticas típicas, podendo ou não acometer mucosas, ou então, evoluir para forma cutânea difusa. A forma cutânea pode apresentar-se de maneira difusa, a qual caracteriza-se pela formação de lesões difusas não ulceradas por toda a pele. A doença se desenvolve por curso crônico e progressivo durante toda a vida do paciente. Já a forma visceral (LV) é uma doença infecciosa sistêmica, de evolução crônica, caracterizada por febre irregular de intensidade média e de longa duração, esplenomegalia, hepatomegalia, acompanhada dos sinais biológicos de anemia, leucopenia, trombocitopenia, hipergamaglobulinemia e hipoalbuminemia (CHAPPUIS et al., 2007).

Essas doenças são consideradas negligenciadas e carregam esse termo pelo fato de serem endêmicas em populações de baixa renda e apresentarem investimentos reduzidos na produção de medicamentos, pesquisas e em seu controle, apesar disso, estão incluídas na relação de doenças prioritárias pela Organização Mundial de Saúde, e no seu programa especial de pesquisa e de treinamento em doenças tropicais. Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS, 2015) 98 países e territórios são endêmicos para leishmanioses. Estima-se

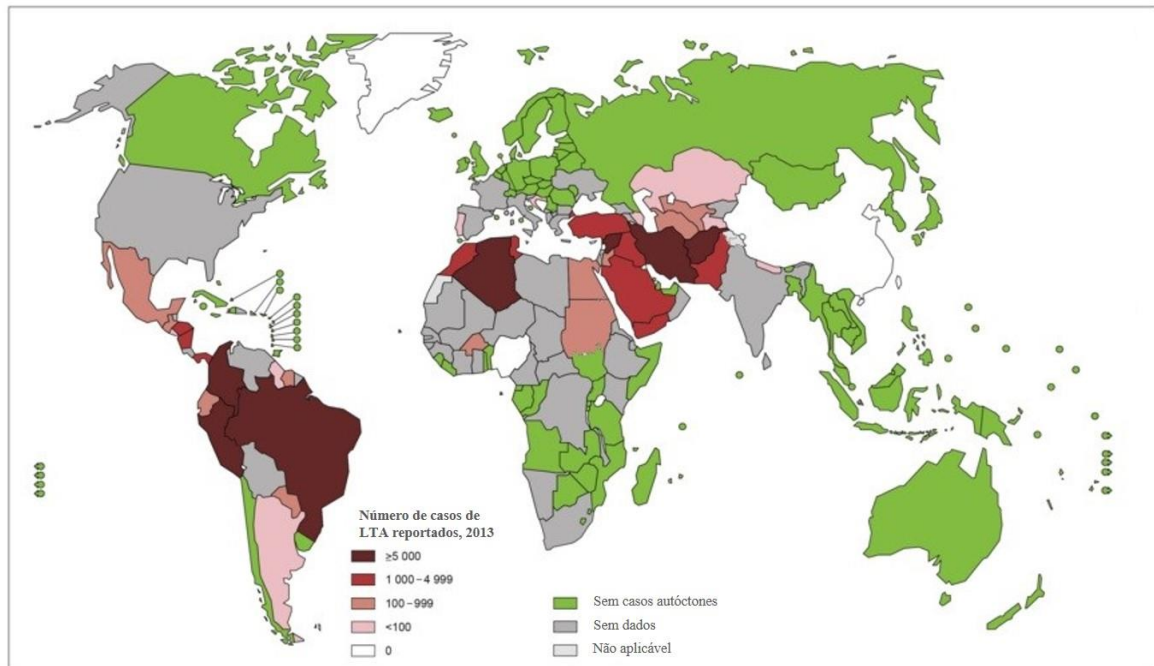
que ocorra 0.2 a 0.4 e 0.7 a 1.2 milhões de novos casos de Leishmaniose Visceral e Leishmaniose cutânea, respectivamente, por ano. Desse total de casos globais de Leishmaniose visceral, 90% ocorrem em apenas seis países: Bangladesh, Brasil, Etiópia, Índia, Sudão e Sudão do Sul (Figura 1). A Leishmaniose cutânea é mais amplamente distribuída, ocorrendo aproximadamente um terço dos casos nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, e no oeste da Ásia. A maioria dos casos de Leishmaniose cutânea ocorre em dez países: Brasil, Afeganistão, Argélia, Colômbia, Costa Rica, Etiópia, Irã, Peru, Sudão e Síria, e juntos contribuem com 70 a 75% dos casos globais de Leishmaniose cutânea (Figura 2).

Figura 1 – Situação da endemicidade de Leishmaniose Visceral no mundo em 2013.



Fonte: Organização Mundial de Saúde, 2015

Figura 2 – Situação da endemicidade de Leishmaniose cutânea no mundo em 2013.



Fonte: Organização Mundial de Saúde, 2015

Ainda de acordo com a OMS, estima-se que 12 milhões de pessoas estejam infectadas e que 350 milhões estão sob o risco de infecção. Esta afecção apresenta uma incidência anual de dois milhões de casos das diferentes formas clínicas, sendo 1,5 milhão de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana e 0,5 milhão de casos de Leishmaniose Visceral com aproximadamente 59 mil óbitos ao ano, sendo, dentre as doenças parasitárias, a segunda com maiores taxas de morbidade e mortalidade (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006).

No Brasil, a partir da década de 80, a LTA vem apresentando aumento no número de casos registrados, variando entre 3000 (1980) e 35.748 (1995). Entre os anos de 1985 e 2005, verifica-se uma média anual de 28.568 casos autóctones registrados. Na década de 80 a LTA estava presente em 19 unidades federativas, no entanto, a partir do ano de 2003 foi confirmada a autoctonia em todos os estados brasileiros (Manual de vigilância da leishmaniose 2013). Entre os anos de 2000 e 2013 foram registrados 345.722 casos de LTA no país. Em 2013, a região Norte

representou 46,4% dos casos, seguida pelas regiões Nordeste (29,5%), Sudeste (6,3%), Centro-Oeste (16,1%) e Sul (1,6%) (SINAN, 2016).

Dos casos de LTA notificados na região Sul, 98,7% ocorreram no Estado do Paraná com notificação em 276 dos 399 municípios. Neste Estado, a LTA tornou-se endêmica a partir de 1980, especialmente nas regiões norte e oeste onde *Leishmania (Viannia) braziliensis* tem sido o agente etiológico predominante (CURTI et al., 2009). No Paraná, assim como em outras localidades, essa doença é de grande complexidade em função da quantidade de fatores envolvidos na determinação da doença, incluindo o grande número de vetores e reservatórios (SCHRIEFER et al., 2005; MONTEIRO et al., 2008).

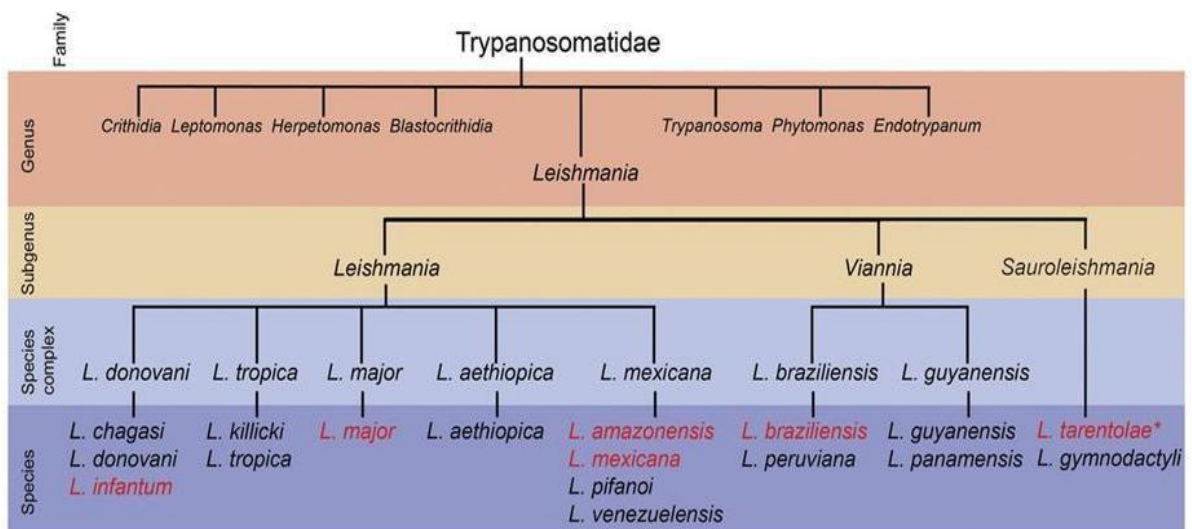
A importância da leishmaniose se explica não apenas por sua alta incidência e distribuição ampla, mas também pela possibilidade da doença assumir formas graves e letais. Além disso, a diversidade de agentes, reservatórios, vetores e a situação epidemiológica evidencia a dificuldade de elaborar medidas de controle eficientes no combate à doença.

## **1.2. Agente etiológico e ciclo biológico**

A Leishmaniose é causada por diferentes espécies de protozoários da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (MICHALICK; RIBEIRO, 2011, p. 41-47) (Figura 3). Desde a criação desse gênero por Ross (1903), o número de espécies descritas tem aumentado constantemente. Como as diferentes espécies são indistinguíveis morfológicamente, vários critérios têm sido adotados para sua identificação, utilizando-se de características extrínsecas (aspectos clínicos, distribuição geográfica, comportamento em cultura e em animais de laboratório ou vetores) e intrínsecas (como os critérios imunológicos, bioquímicos

ou moleculares) (LUMSDEN, 1974; GRIMALDI et al., 1987; RIOUX et al., 1990). No Brasil já foram identificadas sete espécies: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis*, *L. lainsoni*, *L. naiffi*, *L. lindenberg* e *L. shawi* (Manual de vigilância da Leishmaniose tegumentar americana, 2013).

Figura 3 – Classificação do gênero, subgênero e espécies do complexo *Leishmania*.

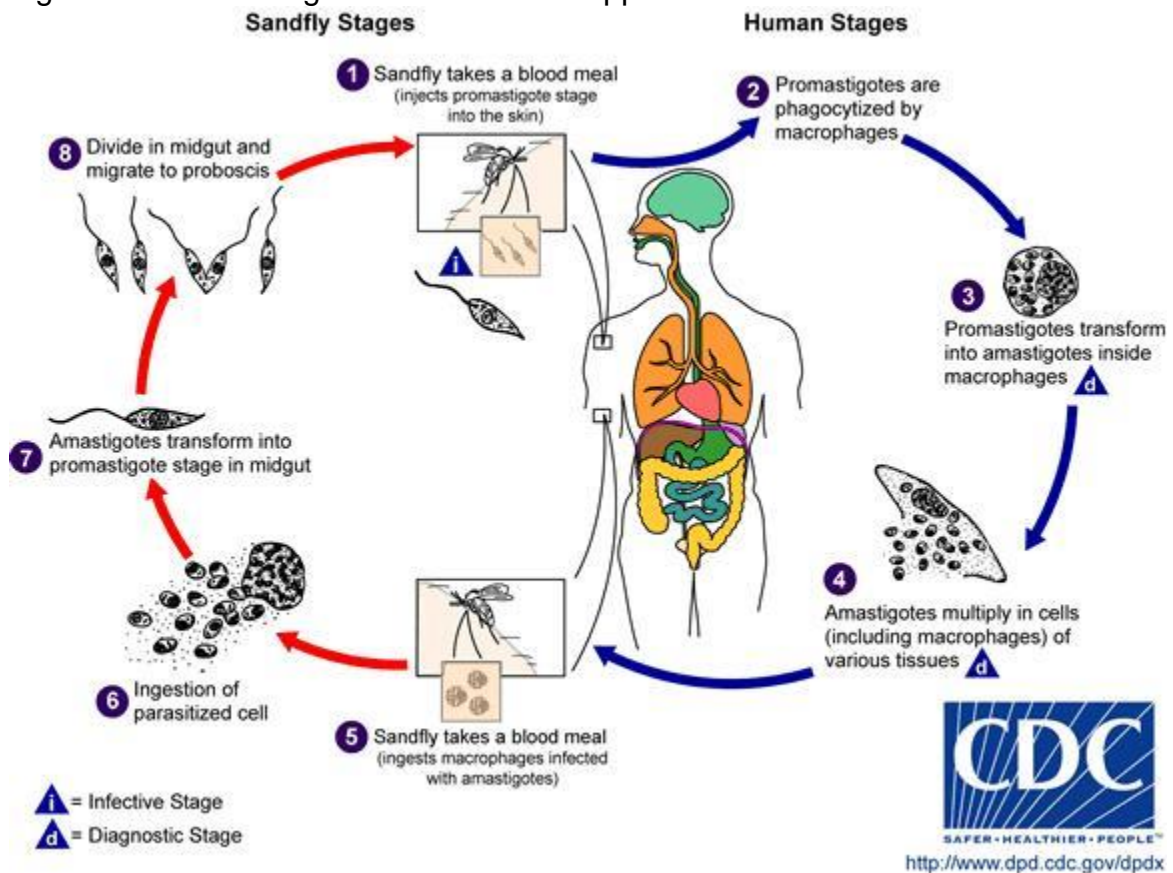


Fonte: Real et al., 2013

Durante o ciclo biológico, o parasito apresenta-se sob duas formas morfológicamente distintas. No hospedeiro vertebrado, encontram-se as formas amastigotas, comportando-se como parasito intracelular obrigatório de células do sistema fagocítico mononuclear, como formas arredondadas e sem flagelo aparente, induzindo uma complexa interação com a resposta imune do hospedeiro (HALL; JOINER, 1991). Estas formas diferenciam-se em promastigotas, no tubo digestivo do inseto vetor, alongada com flagelo externo. As promastigotas passam por um processo de metaciclogênese no inseto vetor, processo fundamental que modifica a estrutura de algumas moléculas de superfície do parasito e dessa maneira permite que o parasito se torne metacíclico e inicie a fase vertebrada (WALTERS, 1993).

A transmissão de *Leishmania* spp. ocorre quando fêmeas hematófagas de flebotomíneos ingerem células infectadas durante o repasto sanguíneo e as amastigotas são liberados no estômago do inseto. As amastigotas transformam-se em promastigotas as quais migram para o trato alimentar do inseto, onde vivem no meio extracelular e se multiplicam por divisão binária. Quando o inseto finalmente realiza o repasto sanguíneo em um mamífero hospedeiro, inocula as promastigotas metacíclicas de *Leishmania* juntamente com a saliva. Após a inoculação, as promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos onde diferenciam-se para a forma amastigota, recomeçando o ciclo (GUPTA; NOYAL; RASTOGI, 2001; AWASTHI, MATHUR, SAHA, 2004) (Figura 4).

Figura 4 - Ciclo biológico de *Leishmania* spp.



Fonte: Centro de Controle e Prevenção de Doenças (CDC - *Centers for Disease Control and Prevention*).

### **1.3. Interação parasito-hospedeiro e resposta imunológica na LTA**

O processo de instalação da LTA no hospedeiro é determinado por uma complexa associação principalmente entre os fatores relacionados à virulência do parasito e a resposta imunológica do hospedeiro. Esta resposta é predominantemente mediada por células, a qual envolve todos os mecanismos associados à cura e proteção ou ao agravamento da doença.

Estudos mais detalhados sobre a imunidade na leishmaniose cutânea experimental foram realizados em modelos murinos isogênicos BALB/c e C57BL/6 infectados com *Leishmania (L.) major* onde foi estabelecido que a ativação preferencial da subpopulação de linfócitos T CD4<sup>+</sup> do tipo 1 (Th 1), produzindo principalmente IFN- $\gamma$ , interleucina - 2 (IL-2), fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF) e fator de necrose tumoral alfa (TNF- $\alpha$ ), que levam a ativação de macrófagos e a destruição dos parasitos estando relacionada à resistência à infecção; enquanto que a ativação preferencial da subpopulação TCD4<sup>+</sup> tipo 2 (Th2) produzindo, entre outras, IL-4 e IL-13 (subpopulação TH2), leva à suscetibilidade à infecção (LAUNOIS et al., 2002 ; AWASTHI, MATHUR, SAHA, 2004).

Uma das estratégias dos macrófagos no combate aos invasores é o “burst” oxidativo induzido com a fagocitose desses organismos. Sendo assim, a enzima iNOS apresenta papel importantíssimo na defesa do hospedeiro, produzindo citrulina e óxido nítrico (NO) a partir da oxidação da L-arginina, sendo que o NO é uma molécula altamente reativa, efetora no combate a microrganismos invasores (QADOUMI et al., 2002). A enzima NADPH oxidase também participa da eliminação

do parasito transferindo prótons para moléculas de oxigênio, formando diversas moléculas altamente reativas, como superóxidos, peróxido de hidrogênio e radicais hidroxila, que interagem então com a membrana do patógeno (CUNNINGHAM, 2002). Outro mecanismo de defesa dos macrófagos é a acidificação das vesículas pela ativação de próton ATPases, o que leva à desnaturação das proteínas, deixando os parasitos suscetíveis à ação de hidrolases ácidas (CUNNINGHAM, 2002).

As citocinas do padrão Th1 estimulam macrófagos na produção de moléculas leishmanicidas, especialmente as citocinas IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , que induzem a expressão de iNOS, enquanto que as citocinas Th2 atuam sobre macrófagos sem levar ao desencadeamento desses mecanismos leishmanicidas destacando as ações das citocinas IL-4 e IL-10 que entre outras funções, induzem a expressão de arginase e síntese de poliaminas, favorecendo assim a replicação dos parasitos nos macrófagos e diminuindo a quantidade de arginina disponível para síntese de NO. Esses mecanismos desencadeados por uma resposta imune do tipo Th2 resultam na evasão do parasito e estabelecimento da infecção (SACKS; NOBAN-TRAUTH, 2002; CUNNINGHAM, 2002; CORRALIZA et al., 1995; INIESTA et al., 2005).

Apesar da resposta desencadeada pelo hospedeiro na tentativa de conter a infecção e eliminar o patógeno, os parasitos do gênero *Leishmania* são capazes de escapar desses mecanismos de defesa e estabelecer a infecção nos macrófagos, resistindo ao pH ácido e às enzimas dos lisossomos (OLIVIER; GREGORY, FORGET, 2005). É sabido que as formas metacíclicas são resistentes à lise mediada pelo sistema complemento, principalmente pela presença de longas moléculas de lipofosfoglicanos (LPG) em sua superfície (SACKS et al., 1995). Uma vez dentro dos macrófagos, devido à presença das moléculas de LPG, esses

parasitos são capazes de inibir a fusão entre o fagossomo e o lisossomo, e resistem às enzimas lisossomais (DESCOTEAUX; TURCO, 1999). Além disso, esses parasitos apresentam a enzima arginase que pode desempenhar um papel regulador de resposta imune, modulando a disponibilidade de arginina diminuindo a atividade da enzima iNOS, responsável pela produção de NO, uma das principais moléculas microbidas produzida por macrófagos ativados (BOGDAN; ROLLINGHOFF, 1999; DA SILVA; FLOETER-WINTER, 2014).

Em humanos, a resposta imune à infecção por *Leishmania* spp. não é tão bem caracterizada como a resposta em modelos murinos, em virtude de sua complexidade e o envolvimento de citocinas, de moléculas microbidas, assim como da saliva do flebotomíneo, dificultando o entendimento de como ocorre à resposta imunológica por parte do hospedeiro. No entanto, os estudos sugerem que em todas as formas clínicas da LTA, a resposta imune é dependente de células T e, de maneira geral, aceita-se que a diferença entre resistência e susceptibilidade à infecção por *Leishmania* está relacionada com a cinética de expansão de células Th1 e Th2, e de outros tipos celulares, como linfócitos T CD8<sup>+</sup> e células NK (PIRMEZ et al., 1993; BACELLAR et al., 2002; LAKHAL-NAOUAR et al., 2015).

Como habitualmente o sistema imune não consegue eliminar completamente os parasitos, essa forte resposta Th1 termina por levar a ocorrência de uma reação inflamatória exacerbada que conseqüentemente origina um intenso dano tecidual, resultando no aparecimento de úlceras na pele e na mucosa. Tem participação importante nesse dano tecidual a produção acentuada de TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  e produção de NO (PIRMEZ et al., 1993; LESSA et al., 2001; CARNEIRO et al., 2015).

Isto confirma o fato de que na maioria dos casos pacientes que contraem a forma cutânea localizada desenvolvem uma resposta exacerbada do tipo Th1 no

nível das lesões. Já nas lesões mucocutâneas, que constituem uma forma crônica associada à destruição de mucosas, a resposta caracteriza-se por uma mistura de polarização Th1 e Th2, enquanto que em pacientes com a forma difusa exibem uma resposta quase exclusivamente do tipo Th2 (CÁCERES-DITTMAR et al., 1993; PIRMEZ et al., 1993; CARVALHO et al., 2012).

Portanto, o quadro clínico é variável conforme a resposta imune celular do hospedeiro, com alta participação de moléculas inflamatórias nos casos de pacientes acometidos pela forma cutânea e de lesões mucosas e usualmente suprimida nos casos de leishmaniose difusa. Já a resposta imune humoral normalmente está presente em todos os tipos de manifestações clínicas. Os níveis de anticorpos observados na forma difusa são elevados, já nas formas cutânea e mucocutânea os níveis são baixos ou discretamente aumentados quando há acometimento de mucosas (REIS; GONTIJO, 2010, p.49-65; CARVALHO et al., 2012).

#### **1.4. Tratamento**

Poucas opções estão disponíveis na clínica para o tratamento das leishmanioses, além disso, a quimioterapia atual requer tratamento prolongado, os compostos apresentam muitos efeitos adversos, alto custo e administração parenteral, fatores estes que dificultam o acesso dos pacientes à terapia. Diante dessas dificuldades, a necessidade de novas estratégias terapêuticas tornou-se urgente no cenário mundial (BARBOSA et al., 2015).

O médico brasileiro Gaspar Vianna, em 1912, introduziu o tratamento de LTA com uso do antimonial tártaro emético, medicamento que por muitos anos foi utilizado na terapêutica, em todo o mundo. Atualmente, os antimoniais pentavalentes ( $Sb^{+5}$ ) são os compostos de escolha para o tratamento da leishmaniose. É

importante ressaltar que são considerados contraindicações ao uso dos antimoniais: as gestantes, os portadores de cardiopatias, nefropatias e hepatopatias (FUNASA, 2000). A anfotericina B é o medicamento utilizado na segunda linha de tratamento, no entanto, este só é utilizado quando não se obtém resposta com o tratamento com o antimonial ou na impossibilidade do seu uso. Contudo, assim como o antimonial, a anfotericina B também apresenta algumas contraindicações como em caso de: gravidez, diabetes, nefropatias com insuficiência renal e cardiopatias. O medicamento é de uso restrito devido aos efeitos adversos que pode apresentar como: calafrios, flebite, anemia, trombocitopenia, anorexia, hipocalcemia e insuficiência renal, estes efeitos colaterais afetam pelo menos um terço dos pacientes (BARBOSA et al., 2015). Apesar de poucos estudos realizados no Brasil, outra possibilidade terapêutica é a utilização da pentamidina, também utilizada como terapia de segunda escolha no tratamento da leishmaniose, principalmente nos casos de leishmaniose mucosa e visceral. Assim como os outros compostos utilizados, esse composto desencadeia muitos efeitos adversos, como: morte súbita, hipoglicemia, hipotensão, nefrotoxicidade, cardiotoxicidade, e também necessita de administração parenteral (BARBOSA, 2015).

Disponível para uso clínico desde a década de 1940, o antimoniato de N-metilglucamina, principal composto para tratamento das leishmanioses no Brasil, não apresenta estrutura química bem conhecida (FREDERIC; SCHETTINI, 2005; LIMA et al., 2007; RATH et al., 2003). O mecanismo de ação desse medicamento baseia-se na interferência da via glicolítica e  $\beta$ -oxidação em amastigotas, através da inibição das enzimas que participam desse processo (SILVA-LÓPEZ, 2010). Além disso, esse composto se mostrou eficiente em inibir a enzima Topoisomerase II de *L. panamensis* e de *L. donovani* (LUCUMI, 1998).

Visando a padronização da terapêutica, a OMS recomenda que a dose utilizada dos antimoniais deva ser calculada em mg de  $Sb^{+5}/kg/dia$  (Manual de vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2013). No entanto, esses compostos apresentam como inconveniente o fato de serem administrados apenas por via parenteral, devendo ser aplicados, em geral, por mais de vinte dias, além de serem tóxicos e de nem sempre se mostrarem eficazes (BLUM et al., 2004) devido, em parte, a emergência de resistência (RODRIGUES et al., 2006) e a diversidade das apresentações clínicas e das espécies de parasitos envolvidos (ROMERO et al., 2001; NAME et al., 2005).

Muito se tem feito no intuito de desenvolver uma vacina efetiva para a doença, onde diversos antígenos, tanto do parasito quanto da saliva do inseto vetor, têm sido identificados e caracterizados como potencialmente eficazes, porém até o momento nenhuma vacina totalmente efetiva foi produzida (REZVAN; MOAFI, 2015).

Portanto, nesse contexto, torna-se urgente a busca pela implementação de novos compostos contra as leishmanioses. É importante que as novas terapias sejam de baixo custo e capazes de auxiliar nos mecanismos de defesa do hospedeiro com o mínimo de efeitos indesejáveis, tornando o tratamento adequado e eficiente. Uma maneira de tentar reduzir os custos e os efeitos adversos na terapia contra a leishmaniose é fazer uso de compostos presentes no cotidiano. É nesse cenário que se encaixa a quercetina, uma molécula encontrada em diversos alimentos, que vem apresentando grande potencial para auxiliar no esquema terapêutico contra a infecção por *Leishmania* spp.

### 1.5. Quercetina

A quercetina (3,3',4',5,7-pentahidroxi-flavona) pertence aos compostos flavonoides polifenólicos bioativos e está presente em uma variedade de alimentos como cebola, tomates, nozes, *Ginkgo biloba*, *Kalanchoe pinata* e *Hypericum perforatum*. Este composto tem gerado interesse considerável devido a uma gama de propriedades farmacológicas e efeitos biológicos já descritos como ação antioxidante, anti-inflamatória, anti-hipertensão, antimicrobianas e antiprotozoaria (BISCHOFF, 2008; MAMANI-MATSUDA et al., 2004).

Em relação à sua ação antiprotozoária, estudos relacionados à família Trypanosomatidae, relataram o efeito leishmanicida da quercetina em experimentos *in vitro* e *in vivo* sob formas amastigota de *Leishmania (L.) donovani* (TASDEMIR et al., 2006) e *L. (L.) amazonensis* (MUZITANO et al., 2006a, b, 2009) e redução da carga parasitária em células do baço e fígado de camundongos infectados com *L. (L.) chagasi* (GOMES et al., 2010).

Estes resultados podem ser explicados devido aos diferentes mecanismos de ação da quercetina sobre o gênero *Leishmania*. Entre esses mecanismos de morte já foram descritos múltiplos alvos deste composto para o tratamento da leishmaniose incluindo, a capacidade deste composto interferir no metabolismo do ferro do parasito devido à quelação deste íon, inibindo a enzima ribonucleótido redutase envolvida na síntese de DNA, exercendo atividade leishmanicida (SEN et al., 2008). Apenas o ferro livre é utilizado pelo parasito para replicação (DAS et al., 2009), e a quercetina é capaz de acessar o citosol da célula, sequestrar o ferro e transferi-lo para a transferrina (BACCAN et al., 2012), desta forma, poderia limitar os níveis de ferro disponíveis para o parasito. Mitra e colaboradores (2000), demonstraram que a quercetina é capaz de inibir o crescimento de *Leishmania donovani* através da

inibição da topoisomerase II levando a apoptose do parasito. Fonseca-Silva e colaboradores. (2011) apresentaram o efeito leishmanicida sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* através da geração de espécies reativas de oxigênio pelo protozoário resultando na despolarização do potencial de membrana mitocondrial, inibindo o crescimento celular deste parasito.

Recentemente, da Silva e colaboradores (2012) demonstraram outro método de ação da quercetina, no qual este composto é capaz de interagir com a arginase biossintetizada pelo parasito, inibindo a síntese de poliaminas essenciais para a proliferação celular.

Além da ação direta no parasito, a quercetina apresenta efeito antiinflamatório importante. Sabe-se que o processo inflamatório na LTA ocorre devido a intensa resposta Th1 com produção acentuada de TNF- $\alpha$  e NO resultando no dano tecidual. Estudos *in vitro* mostram que a quercetina suprime a produção das enzimas inflamatórias ciclooxigenase-2 e a produção de prostaglandina E (2), as quais estão envolvidas na inflamação e dano tecidual (XIAO et al., 2011).

Muitos autores têm demonstrado a ação da quercetina sobre a síntese de citocinas proinflamatórias, estresse oxidativo e dor em diversos modelos experimentais. Esse composto é capaz de suprimir a ativação de fatores de transcrição como NF-Kb e T-bet envolvidos na expressão de uma diversidade de citocinas proinflamatórias como TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-2 IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8 e assim reduzir a inflamação (MIN et al., 2007; QURESHI et al., 2011; VALÉRIO et al., 2009; YU et al., 2008; WILLAIN FILHO et al., 2008).

Neutrófilos também são importantes alvos da quercetina, uma vez que fazem parte do processo inflamatório. Esse composto é capaz de inibir o recrutamento de

neutrófilos através da inibição da polimerização da actina, resultando na diminuição da migração excessiva desta célula durante a inflamação (SOUTO et al., 2011).

Embora existam evidências experimentais descritas quanto aos efeitos da quercetina, é impossível afirmar que este flavonóide seja efetivo contra todas as espécies envolvidas na Leishmaniose, uma vez que diferenças intrínsecas já foram demonstradas dentro do gênero *Leishmania* (OLIVEIRA; BRODSKYN, 2012). Peacock e colaboradores (2007) demonstraram que genes diferencialmente distribuídos entre as espécies codificam proteínas envolvidas na interação parasito-hospedeiro e na sobrevivência do parasito no interior dos macrófagos.

Portanto, as diferenças genéticas dentro do gênero *Leishmania* precisam ser consideradas ao testar novos compostos. Especificamente com relação à *Leishmania (V.) braziliensis*, espécie responsável por causar casos graves de Leishmaniose mucocutânea, existem poucos estudos que demonstraram o efeito da quercetin. Marín e colaboradores (2009) demonstraram o efeito da quercetina sobre formas promastigotas de *Leishmania (V.) peruviana* e *Leishmania (V.) braziliensis* e avaliaram a capacidade de derivados acetilados na infecção da linhagem de macrófagos J774.2. Embora tenham observado efeito promissor dos derivados acetilados, os autores não utilizaram a quercetina propriamente dita nos ensaios com macrófagos. (MARÍN et al., 2009). Portanto, nenhum estudo avaliou a eficiência da quercetina no contexto de macrófagos primários infectados por *Leishmania (V.) braziliensis*. Sendo assim, o presente trabalho teve como objetivo avaliar os efeitos *in vitro* e o potencial mecanismo de ação da quercetina na infecção experimental de macrófagos por *Leishmania (V.) braziliensis*.

## 2 REFERÊNCIAS

- ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitology**. London. 22, 552-557. Dez, 2006
- AWASTHI, A.; MATHUR, R. K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **The Indian Journal of Medical Research**. 119., 6., 238-258. Jun, 2004.
- BACCAN, M. M.; CHIARELLI-NETO, O.; PEREIRA, R. M. S.; ESPÓSITO, B. P. Quercetin as a shuttle for labile iron. **Journal of Inorganic Biochemistry** 107., 1., 34-39. Fev, 2012.
- BACELLAR, O.; LESSA, H.; SCHRIEFER, A.; MACHADO, P.; JESUS, A. R.; DUTRA, W. O.; GOLLOB, K. J.; CARVALHO, E. M.. Up-regulation of Th1-type responses in mucosal leishmaniasis patients. **Infection and Immunity**. 70., 12., 6734-40. Dez, 2002.
- BARBOSA, J. F.; FIGUEIREDO, S. M.; MONTEIRO, F. M.; ROCHA-SILVA, F.; GACIELE-MELO, C.; COELHO, S. S.; LYON, S.; CALIGIORNE, R. B. New Approaches on Leishmaniasis Treatment and Prevention: A Review of Recent Patents. **Recent patents on endocrine, metabolic & immune drug discovery**. 9., 2., 90-102. 2015
- BISCHOFF, S.C. Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. **Current Opinion in Clinical Nutrition and Metabolism Care**. 11., 6., 733-740. Nov, 2008.
- BLUM, J. DESJEUX, P.; SCHWARTZ, E.; BECK, B.; HATZ, C. Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Among Travellers. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 53., 2., 158-166. Fev, 2004.
- BOGDAN, C.; ROLLINGHOFF, M. How do protozoan parasites survive inside macrophages? **Parasitology Today**. 15., 1., 22-28. Jan 1999.
- CÁCERES-DITTMAR, G.; TAPIA, F. J.; SÁNCHEZ, M. A.; YAMAMURA, M.; UYEMURA, K.; MODLIN, R. L.; BLOOM, B. R.; CONVIT, J. Determination of the cytokine profile in American cutaneous leishmaniasis using the polymerase chain reaction. **Clinical and Experimental Immunology**. 91., 3., 500-505. Mar, 1993.
- CARNEIRO, M. B.; LOPES, M. E.; VAZ, L. G.; SOUSA, L. M.; SANTOS, L. M.; SOUZA, C. C.; CAMPOS, A. C.; GOMES, D. A.; GONÇALVES, R.; TAFURI, W. L.; VIEIRA, L. Q. IFN- $\gamma$ -Dependent Recruitment of CD4+ T Cells and Macrophages Contributes to Pathogenesis During *Leishmania amazonensis* Infection. **Journal of Interferon and Cytokine Research**. 35., 12., 935-47. Dez, 2015.
- CARVALHO, L.P.; PASSOS, S.; SCHRIEFER, A.; CARVALHO, E. M. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. **Frontiers in immunology**. 3., 301. Jan, 2012.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R. W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. **Nature Reviews Microbiology**. 5., 873-882. Nov, 2007.

CORRALIZA, I. M.; SOLER, G.; EICHMANN, K.; MODOLELL, M. Arginase induction by suppressors of nitric oxide synthesis (IL-4, IL-10 and PGE2) in murine bone-marrow derived macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**. 206., 2., 667-673. Jan, 1995.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**. 72., 2., 132-141. Abr, 2002.

CURTI, M. C. M.; SILVEIRA, T. G. V.; ARRAES, S. M. A. A.; BERTOLINI, D. A.; ZANZARINI, P. D.; VENZAZZI, E. A. S.; FERNANDES, A. C. S.; TEIXEIRA, J. J. V.; LONARDONI, M. V. C. Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana na região Noroeste do Estado do Paraná. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**. 30., 1., 63-68. Jul, 2009.

DA SILVA, E.R.; MAQUIAVELI, C.C.; MAGALHÃES, P. P. The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase. **Experimental Parasitology**. 130., 3., 183-8. Mar, 2012.

DA SILVA, M. F.; FLOETER-WINTER, L. M.; Arginase in *Leishmania*. **Sub-cellular Biochemistry**. 74., 103-17. 2014

DAS, N. K.; BISWAS, S.; SOLANKI, S.; MUKHOPADHYAY, C. K. *Leishmania donovani* depletes labile iron pool to exploit iron uptake capacity of macrophage for its intracellular growth. **Cellular Microbiology** 11., 1., 83-94. Jan, 2009

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease*. 1455., 2-3., 341-352. Out, 1999.

FONSECA-SILVA, F.; INACIO, J. D. F.; CANTO-CAVALHEIRO, M. M.; ALMEIDA-AMARAL, E. E. Reactive Oxygen Species Production and Mitochondrial Dysfunction Contribute to Quercetin Induced Death in *Leishmania amazonensis*. **PLoS ONE** 6., 2., e14666. Fev, 2011.

FREDERIC, F.; SCHETTINI, A. D. Lipossomas: propriedades físico-químicas e farmacológicas, aplicações na quimioterapia à base de antimônio. **Química Nova**, São Paulo, 28., 3., 511-518. 2005.

FUNASA- Manual de Controle da Leishmaniose Tegumentar Americana / Organização: Gerência Técnica de Doenças Transmitidas por Vetores e Antropozoonoses. - Coordenação de Vigilância Epidemiológica - Centro Nacional de Epidemiologia – Fundação Nacional de Saúde - Ministério da Saúde. Brasília – p: 7-28, 2000.

REIS, A. B.; GONTIJO, C. M. F. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: NEVES, D.P. *et al.* Parasitologia Humana. São Paulo: Atheneu, 2011. p. 49-65.

GOMES, D.C.O.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S.; ROSSI-BERGMANN, B. Effectiveness of the immunomodulatory extract of *Kalanchoe pinnata* against murine visceral leishmaniasis. **Parasitology** 137., 4., 613–618. Dez, 2010.

GONTIJO, B.; CARVALHO, M. L. R.. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 36(1):71-80, jan-fev, 2003.

GRIMALDI, J.R.G.; DAVID, J.R.; MCMAHON-PRATT, D. Identification and distribution of New World *Leishmania* species characterized by serademe analysis using monoclonal antibodies. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 36., 270-287. 1987.

GUPTA, N.; NOYAL, N.; RASTOGI, A. K. *In vitro* cultivation and characterization of axenic amastigotes of *Leishmania*. **Trends in Parasitology**. 17., 3., 150-153. Mar, 2001.

HALL, B. F.; JOINER, K. A. Strategies of obligate intracellular parasites for evading host defences. **Immunology Today**. 12., 3., A22-7, 1991.

INIESTA, V.; CARCELEN, J.; MOLANO, I.; PEIXOTO, P. M.; REDONDO, E.; PARRA, P.; MANGAS, M.; MONROY, I.; CAMPO, M. L.; NIETO, C. G.; CORRALIZA, I. Arginase I induction during *Leishmania major* infection mediates the development of disease. **Infection and Immunity**. 73., 9., 6085-6090. Set, 2005.

LAKHAL-NAOUAR, I.; SLIKE, B. M.; ARONSON, N. E.; MAROVICH, M. A. The Immunology of a Healing Response in Cutaneous Leishmaniasis Treated with Localized Heat or Systemic Antimonial Therapy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**. 9., 10., e0004178. Out, 2015

LAUNOIS, P.; GUMY, A.; HIMMELRICH, H.; LOCKSLEY, R. M.; ROCKEN, M.; LOUIS, J. A. Rapid IL-4 production by *Leishmania* homolog of mammalian RACK1-reactive CD4+ T-cells in resistance mice treated once with anti-IL-12R or IFN- $\gamma$  antibodies at the onset of infection with *Leishmania major* instructs Th2 cell development, resulting in nonhealing lesions. **The Journal of Immunology**. 168., 9., 4628-4635. Mai, 2002.

LESSA, H. A.; MACHADO, P.; LIMA, F.; CRUZ, A. A.; BACELLAR, O.; GUERREIRO, J.; CARVALHO, E. M. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 65., 2., 87-9. Ago, 2001.

LIMA, E. B.; PORTO, C.; MOTTA, J. O. C.; SAMPAIO, R. N. R. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, Rio de Janeiro. 82., 2., 111-124, 2007.

LUCUMI, A.; ROBLEDO, S.; GAMA, V.; SARAIVA, N. G. Sensitivity of *Leishmania viannia panamensis* to pentavalent antimony is correlated with the formation of cleavable DNA-protein complexes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 42., 8., 1990-1995. Ago, 1998.

LUMSDEN, W.H. Letter: Biochemical taxonomy of *Leishmania*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**. 68., 1., 74-75. Jan, 1974.

MAMANI-MATSUDA, M.; RAMBERT, J.; MALVY, D.; LEJOLY-BOISSEAU, H.; DAULOUEDE, S.; THIOLAT, D.; COVES, S.; COURTOIS, P.; VINCENDEAU, P.; MOSSALAYI, M. D Quercetin induces apoptosis of *Trypanosoma brucei gambiense* and decreases the proinflammatory response of human macrophages. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 48., 3., 924–929. Mar, 2004.

MARÍN, C.; BOUTALEB-CHARKI, S.; DÍAZ, J. G.; HUERTAS, O.; ROSALES, M. J.; PÉREZ-CORDON, G.; GUITIERREZ-SÁNCHEZ, R.; SÁNCHEZ-MORENO, M. Antileishmaniasis activity of flavonoids from *Consolida oliveriana*. **Journal of Natural Products**. 72., 6., 1069-1074. Jun, 2009

MEARS, E. R; MODABBER, F.; DON, R.; JOHNSON, G. E. A Review: The Current In Vivo Models for the Discovery and Utility of New Anti-leishmanial Drugs Targeting Cutaneous Leishmaniasis. **PLoS Neglected and Tropical Disease**. 9., 9., e0003889. Set, 2015.

MIN, Y. D.; CHOI, C.-H.; BARK, H.; SON, H. Y.; PARK, H.-H.; LEE, S.; PARK, J. W.; PARK, E. K.; SHIN, H. I.; KIM, S. H. Quercetin inhibits expression of inflammatory cytokines through attenuation of NF-kappaB and p38 MAPK in HMC-1 human mast cell line. **Inflammation Research** 56., 5., 210-5. Mai, 2007.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. – 2. ed. atual. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde. (Serie A. Normas e Manuais Técnicos) 180. 2013.

MITTRA, B.; SAHA, A.; CHOWDHURY, A. R.; PAL, C.; MANDAL, S.; MUKHOPADHYAY, S.; BANDYOPADHYAY, S.; MAJUMDER, H. K. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. **Molecular Medicine**. 6., 6., 527–541. Jun, 2000.

MONTEIRO, W. M.; NEITZKE, H. C.; LONARDONI, M. V. C.; SILVEIRA, T. G. V.; FERREIRA, M. E. M. C. TEODORO, U. Distribuição geográfica e características epidemiológicas da leishmaniose tegumentar americana em áreas de colonização antiga do Estado do Paraná, Sul do Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**. Rio de Janeiro. 24., 6.,: 1291-1303. Jun, 2008.

MUZITANO, M. F.; FALCÃO, C. A.; CRUZ, E. A.; BERGONZI, M. C.; BILIA, A. R.; VINCIERI, F. F.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S. S. Oral metabolism and efficacy of *Kalanchoe pinnata* flavonoids in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **Planta Medica**. 75., 4., 307–311. Mar, 2009.

MUZITANO, M. F.; CRUZ, E. A.; DE ALMEIDA, A. P.; DA SILVA, S. A., KAISER, C. R.; GUETTE, C.; ROSSI-BERGMANN, B.; COSTA, S. S. Quercitrin: an antileishmanial flavonoid glycoside from *Kalanchoe pinnata*. **Planta Medica**. 72., 1., 81–83. Jan, 2006a.

MUZITANO, M. F., TINOCO, L. W., GUETTE, C., KAISER, C. R., ROSSI-BERGMANN, B., COSTA, S. S. The antileishmanial activity assessment of unusual flavonoids from *Kalanchoe pinnata*. **Phytochemistry** 67., 18., 2071–2077. Set, 2006b.

NAME, R. Q.; BORGES, K. T.; NOGUEIRA, L. S. C.; SAMPAIO, H. D.; TAUIL, P. L.; SAMPAIO, R. N. R. Estudo clínico, epidemiológico e terapêutico de 402 pacientes com leishmaniose tegumentar americana atendidos no Hospital Universitário de Brasília, DF, Brasil. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. Rio de Janeiro. 80., 3., 249-254. Mai-Jun, 2005.

MICHALICK, M. S. M., RIBEIRO, R. R. Gênero *Leishmania*. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 12<sup>a</sup> ed. São Paulo: Atheneu, 2011. P. 41-47.

OLIVEIRA, C. I.; BRODSKY, C. I. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. **Frontiers in Immunology**. 2012

OLIVIER, M.; GREGORY, D. J.; FORGET, G. Subversion mechanism by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view. **Clinical Microbiology Reviews**. 18., 2., 293-305. Abr, 2005.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Programmes and Projects: Leishmaniasis- Burden of disease. Acessado em 20 de janeiro de 2016 <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>

PEACOCK, C. S.; SEEGER, K.; HARRIS, D.; MURPHY, L.; RUIZ, J. C.; QUAIL, M. A.; PETERS, N.; ADLEM, E.; TIVEY, A.; ASLETT, M.; KERHORNOU, A.; IVENS, A.; FRASER, A.; RAJANDREAM, M. A.; CARVER, T.; NORBERTCZAK, H.; CHILLINGWORTH, T.; HANCE, Z.; JAGELS, K.; MOULE, S.; ORMOND, D.; RUTTER, S.; SQUARES, R.; WHITEHEAD, S.; RABBINOWITSCH, E.; ARROWSMITH, C.; WHITE, B.; THURSTON, S.; BRINGAUD, F.; BALDAUF, S. L.; FAULCONBRIDGE, A.; JEFFARES, D.; DEPLEDGE, D. P.; OYOLA, S. O.; HILLEY, J. D.; BRITO, L. O.; TOSI, L. R.; BARRELL, B.; CRUZ, A. K.; MOTTRAM, J. C.; SMITH, D. F.; BERRIMAN, M. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. **Nature Genetics**. 39., 7., 839-847. Jul, 2007.

PIRMEZ, C.; YAMAMURA, M.; UYEMURA, K.; PAES-OLIVEIRA, M.; CONCEIÇÃO-SILVA, F.; MODLIN, R. L. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. **Journal of Clinical Investigation**. 91., 4., 1390-1395. Abri, 1993.

QADOUMI, M.; BECKER, I.; DONHAUSER, N.; RÖLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Expression of inducible nitric oxide synthase in skin lesions of patients with american cutaneous leishmaniasis. **Infection and Immunity**. 70., 8., 4638-4642. Ago, 2002.

QURESHI, A. A.; REIS, J. C.; QURESHI, N.; PAPASIAN, C. J.; MORRISON, D. C.; SCHAEFER, D. M.  $\delta$ -Tocotrienol and quercetin reduce serum levels of nitric oxide and lipid parameters in female chickens. **Lipids in Health and Disease**. 10:39. Fev, 2011.

RATH, S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C.; ANDRADE JUNIOR, H. F.; TEMPONE, A. G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da Arte. **Química Nova**, São Paulo. 26., 4., Jul-Ago, 2003.

REAL, F.; VIDAL, R. O.; CARAZZOLLE, M. F.; MONDEGO, J.M.; COSTA, G.G.; HERAI, R.H.; WÜRTELE, M.; DE CARVALHO, L.M.; CARMONA E FERREIRA, R.; MORTARA, R.A.; BARBIÉRI, C.L.; MIECZKOWSKI, P.; DA SILVEIRA, J.F.; BRIONES, M.R.; PEREIRA, G.A.; BAHIA, D. The Genome Sequence of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: Functional Annotation and Extended Analysis of Gene Models. **DNA Research**. 20., 6., 567-81. Jul, 2013

REZVAN, H.; MOAFI, M. An overview on *Leishmania* vaccines: A narrative review article. **Veterinary research forum**. 6., 1., 1-7. Mar, 2015.

RIOUX, J.A.; DEREURE, J.; KHIAMI, A.; PRATLONG, F.; SIRDAR, K.; LAMBERT, M. Ecoepidemiology of leishmaniasis in Syria. 1. *Leishmania major* Yakimoff and Schokhor (Kinetoplastida-Trypanosomatidae) infestation of *Psammomys obesus* Cretzschmar (Rodentia-Gerbillidae). **Annales de Parasitologie Humaine et Comparée**. 65., 5-6.,: 203-7. 1990.

RODRIGUES, A. M.; HUEB, M.; SANTOS, T.A.; FONTES, C. J. Factors associated with treatment failure of cutaneous leishmaniasis with meglumine antimoniate. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 39., 2., 139-45. Mar-Abr, 2006.

ROMERO, G.A.S. GUERRA, M. V.; PAES, M.G.; MACÊDO, V.O. Comparison of Cutaneous Leishmaniasis Due to *Leishmania (Viannia) Braziliensis* and *L.(V.) Guyanensis* in Brazil: Therapeutic Response to Meglumine Antimoniate. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. 65., 5., 456-465. Nov, 2001

ROSS, R. Note on the bodies recently described by Leishman and Donovan. **The Britan Medical Journal**. 14., 2., 1261-62. Nov, 1903.

SACKS, D., NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunol**. 2., 11., 845-858. Nov, 2002.

SACKS, D. L.; PIMENTA, P. F.; McCONVILLE, M. J.; SCHNEIDER, P.; TURCO, S. J. Stage-specific binding of *Leishmania donovani* to the sand fly vector midgut is regulated by conformational changes in the abundant surface lipophosphoglycan. **Journal of Experimental Medicine**. 181., 2., 685-697. Fev, 1995.

SCHRIEFER, A. L. F.; SOUSA, R. S.; GUIMARÃES, L. H.; GÓES-NETO, A., ALBERT SCHRIEFER, A. Papel do Parasita e do Hospedeiro na Expressão Clínica das Leishmanioses. **Gazeta médica da Bahia**. 75., 1., 46-56. Jan-Jun, 2005

SEN, G., MUKHOPADHYAY, S., RAY, M., BISWAS, T. Quercetin interferes with iron metabolism in *Leishmania donovani* and targets ribonucleotide reductase to exert

leishmanicidal activity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**. 61., 5., 1066–1075. Mai, 2008.

SILVA-LÓPEZ, R. E. D. Proteases de *Leishmania*: novos alvos para o desenvolvimento racional de fármacos. **Química Nova**. 33., 7., 1541-1548. 2010.

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?sinannet/lta/bases/ltabrnet.def>. Acesso em 20/01/2016.

SOUTO, F. O.; ZARPELON, A. C.; FERRARI, L. S.; FATTORI, V.; CASAGRANDE, R.; FONSECA, M. J. V.; CUNHA, T. M.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; VERRI, W. A. JR. Quercetin reduces neutrophil recruitment induced by CXCL8, LTB4, and fMLP: inhibition of actin polymerization. **Journal of Natural Products**. 74., 2., 113-118. Fev, 2011.

TASDEMIR, D.; KAISER, M.; BRUN, R.; YARDLEY, V.; SCHMIDT, T.J.; TOSUN, F.; RÜEDI, P. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: in vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**. 50., 4., 1352–1364. Abr, 2006.

VALÉRIO, D. A.; GEORGETTI, S. R.; MAGRO, D. A.; CASAGRANDE, R.; CUNHA, T. M.; VICENTINI, F. T. M. C.; VIEIRA, S. M.; FONSECA, M. J. V.; FERREIRA, S. H.; CUNHA, F. Q.; VERRI, W. A. JR. Quercetin reduces inflammatory pain: inhibition of oxidative stress and cytokine production. **Journal of Natural Products**. 72., 11., 1975-9. Nov, 2009.

STEBUT, V. E. Leishmaniasis. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**. 40., 3., 191-201. Fev 2015

WALTERS, L. L. *Leishmania* differentiation in natural and unnatural sandfly host. **Journal of Eukaryotic Microbiology**. 40., 2., 196-206. Mar-Abr, 1993.

WILLAIN FILHO, A.; CECHINEL FILHO, V.; OLINGER, L.; DE SOUZA, M. M. Quercetin: further investigation of its antinociceptive properties and mechanisms of action. **Archives of pharmacal research**. 31., 6., 713-21. Jun, 2008.

XIAO, X.; SHI, D.; LIU, L.; WANG, J.; XIE, X.; KANG, T.; DENG, W. Quercetin Suppresses Cyclooxygenase-2 Expression and Angiogenesis through Inactivation of P300 Signaling. **PLoS ONE** 6., 8., e22934. Ago, 2011.

YU, E. S.; MIN, H. J.; AN, S. Y.; WON, H. Y.; HONG, J. H.; HWANG, E. S. Regulatory mechanisms of IL-2 and IFN- $\gamma$  suppression by quercetin in T helper cells. **Biochemical Pharmacology**. 76., 1., 70-8. Abr, 2008.



### 3 OBJETIVOS

#### 3.1. Objetivo Geral

Investigar a atividade *in vitro* do flavonóide quercetina sobre macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania (V.) braziliensis*, bem como elucidar os mecanismos de ação.

#### 3.2. Objetivos específicos

Analisar *in vitro* a ação de diferentes concentrações de quercetina sobre formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*.

Avaliar, através de ensaio fagocítico, a capacidade leishmanicida de macrófagos peritoneais infectados com *Leishmania (V.) braziliensis* e tratados com quercetina.

Determinar os níveis das citocinas IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-10 e IL-12 em sobrenadante de cultura de macrófagos infectados e tratados com quercetina.

Avaliar os níveis da enzima óxido nítrico sintase (iNOS) e de óxido nítrico no sobrenadante de cultura dos macrófagos infectados e tratados.

Determinar a concentração de ferro livre e ferro ligado à transferrina em macrófagos infectados com *Leishmania (V.) braziliensis*.

Avaliar a regulação de NRF-2 em macrófagos infectados e tratados.

## 4 PRODUÇÃO CIENTÍFICA

### 4.1. Artigo

Quercetin modulates *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* infection in vitro by upregulating NRF2 expression and affecting iron availability

Artigo a ser submetido para edição especial anual "*Immunology and Infection by Protozoan Parasites*" ao periódico *Mediators of Inflammation*.

FULL ARTICLE

**Quercetin modulates *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection *in vitro* by upregulating NRF2 expression and affecting iron availability**

Allan Henrique Depieri Cataneo<sup>a\*</sup>, Fernanda Tomiotto-Pellissier<sup>a</sup>, Milena Menegazzo Miranda<sup>a</sup>, Carolina Panis<sup>b</sup>, Andrea Name Colado Simão<sup>c</sup>, Rubens Cecchini<sup>a</sup>, Rubia Casagrande<sup>d</sup>, Waldiceu Ap. Verri Jr<sup>a</sup>, Ivete Conchon-Costa<sup>a</sup>, Wander Rogério Pavanelli<sup>a</sup>.

<sup>a</sup> Department of Pathology Science, Center of Biological Sciences, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

<sup>b</sup> Laboratory of Inflammatory Mediators, State University of Western Paraná, Francisco Beltrão, Paraná, Brazil.

<sup>c</sup> Department of Pathology Science, Clinical Analysis and Toxicology, Health Sciences Center, State University of Londrina, Londrina, Paraná, Brazil.

<sup>d</sup> Department of Pharmaceutical Science, Health Sciences Center, State University of Londrina

\*Corresponding author. Laboratory of Parasitology, Center of Biological Sciences, State University of Londrina, Celso Garcia Rod, Pr-445, Km380, Londrina, Paraná, Brazil. Phone number: +55 43 33714539. Zip Code: 86057970.

E-mail address: wanderpavanelli@yahoo.com.br

## Abstract

American cutaneous leishmaniasis is a zoonotic disease caused by protozoans of the genus *Leishmania*, and has as its main characteristic the formation of painless ulcerated lesions with intense red colored edges. The treatment of cutaneous leishmaniasis is unsatisfactory and has limited efficacy, prolonged treatment, high cost and undesirable side effects to the host, which has prompted the search for new therapeutic strategies. Accordingly, the present work aimed to evaluate the *in vitro* effect of the flavonoid quercetin in experimental leishmaniasis. In an attempt to evaluate the leishmacidal and immunomodulatory activity, we performed a direct assay on promastigote forms of *Leishmania (Viannia) braziliensis* (*L. braziliensis*) and phagocytic assay. Quercetin inhibited the proliferation of promastigote forms at all concentrations tested and reduced the number of parasites in *L. braziliensis*-infected macrophages. Our results showed that quercetin did not modulate the cytokine or nitric oxide profile, suggesting that the mechanism involved in *L. braziliensis* elimination is not dependent on these mediators. Our data indicated that the mechanism by which quercetin exerts its antileishmanial effects involves the modulation of the labile iron pool which culminates in a depletion of available iron for *L. braziliensis* replication.

**Keywords:** Leishmaniasis, Natural Compound, Flavonoid, Cytokine, Nitric Oxide, Antioxidant.

# 1. Introduction

American cutaneous leishmaniasis, a disease caused by protozoans of the genus *Leishmania*, has zoonotic features and constitutes a serious public health problem in 88 countries worldwide, affecting around 1.5 million people annually. The pathogenic and clinical aspects of leishmaniasis depend on factors associated with the protozoan species and the immune response of the host (Herwaldt, 1999; Murray et al., 2005; Reithinger et al., 2007). In Brazil, among the various *Leishmania* species, *L. braziliensis* is the major etiological agent of cutaneous and mucosal leishmaniasis, which occurs in ~10% of *L. braziliensis*-infected patients (Silva et al., 2013; Maciel-Rezende et al., 2013; Detoni et al., 2013; Alves-Ferreira et al., 2015).

Cutaneous leishmaniasis causes ulcerated lesions, which can persist for months or years. Besides this clinical form, this specie can also cause mucosal leishmaniasis, characterized by large ulcerated lesions that affect cartilage and mucosa due to the spreading of the parasite in the bloodstream, resulting in disfiguring lesions that impact quality of life (Mears et al., 2015).

The first line of drugs used in the treatment of tegumentary leishmaniasis is based on pentavalent antimonials such as sodium stibogluconate (Pentostam) and antimoniate N-methyl-glucamine (Glucantime); however, the mechanism of action of these drugs is limited due to the intracellular localization of the parasite and presents highly toxicity to the host such as arthralgia (Rodrigues et al., 2006), hepatotoxicity and cardiotoxicity (Balaña-Fouce et al., 1998), and besides, there have been some cases of drug resistance (Rodrigues et al., 2006), restricting its use (Rath et al., 2003). In some cases, the lack of response to pentavalent antimonials are observed and the use of a second-line drugs is required, such as amphotericin B or pentamidines, but these drugs present similar limitations and toxicity (Sundar and Chakravarty, 2014). Thus, alternative therapies for tegumentary leishmaniasis, more efficient

and less toxicity are needed. Therefore, natural compounds could complement current antimonial therapy or even help control the disease in cases of disease recurrence or resistance.

Accordingly, quercetin has been pointed out as a prominent target of investigations on alternative therapy against *Leishmania*. Quercetin is a flavonoid that is widely distributed in foods and medicinal plants and has important known biological properties, such as antiinflammatory, antioxidant, antiprotozoal (Mamani-Matsuda et al., 2004; Boots et al., 2008), antibacterial (Puupponen-Pimiä et al., 2001), antiviral (Chiang et al., 2003) and antiproliferative in human cells (Csokay et al., 1997; Chan et al., 2013) activities. The *in vitro* leishmanicidal activity of quercetin has already been reported against promastigotes forms of *L. (L.) amazonensis* (Fonseca-Silva F et al., 2011) and amastigote forms of *L. (L.) amazonensis* and *L. (L.) donovani* (Tasdemir et al., 2006). Some mechanisms of action of this flavonoid on *Leishmania* species have already been described but are not fully elucidated. Sen et al (2008) showed that quercetin interferes with iron metabolism of the *L. donovani*, inhibiting ribonucleotide reductase activity, an essential enzyme involved in the parasite's DNA synthesis, where this enzyme needs iron to exert its function. Mitra et al., (2000) also demonstrated the action of this flavonoid in *L. donovani* promastigote forms, promoting apoptosis by inhibiting topoisomerase II. Other mechanism described against promastigote forms include mitochondrial dysfunction with consequent reactive oxygen species production in *L. amazonensis* (Fonseca-Silva et al., 2011) and inhibition of essential polyamines pathway (da Silva et al., 2012).

Although these effects of quercetin have been described, it is impossible to affirm that this flavonoid can be effective against all *Leishmania* species, since intrinsic differences within the genus *Leishmania* have been demonstrated (De Oliveira and Brodskyn, 2012). Peacock et al. (2007) showed genes that are differentially distributed between the *Leishmania*

species encode proteins implicated in host-pathogen interactions and parasite survival in the macrophage. In this study, RNAi have only been found in *L. braziliensis*, moreover, this RNAi machinery is totally functional in *L. braziliensis* and absent in other *Leishmania* species (Lye et al., 2010). Such differences within genus *Leishmania* need to be considerate when addressing new antileishmanial compounds. Regarding to *L. braziliensis*, there are few studies that have demonstrated the effect of quercetin, and these works have just evaluated the effect of this compound against promastigote forms only (Marín et al., 2009; Gundampati et al., 2014). Besides, there are no studies that have evaluated quercetin efficacy and its probable mechanism of action in *L. braziliensis*-infected macrophages.

Taking into account the above-mentioned evidence, quercetin was evaluated for its *in vitro* effect against *L. braziliensis* parasites. Accordingly, we performed *in vitro* assays to investigate the effect of quercetin on promastigote forms as well as leishmanicidal action in *L. braziliensis*-infected macrophages. We further investigated a putative mechanism of action of this compound as a modulator of molecules such as cytokines, nitric oxide, and labile iron pool and revealed the importance of nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) affecting iron availability in this experimental model.

## **2. Material and Methods**

### **2.1. *Leishmania (Viannia) braziliensis* culture**

*L. braziliensis* (MHOM/BR/1987/M11272) was used as promastigote forms in the stationary growth phase (day 5 of culture). The parasites were obtained from popliteal lymph nodes of *L. braziliensis*-infected Golden Syrian hamster and maintained in 199 culture medium (GIBCO Invitrogen) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; GIBCO Invitrogen), 1 M HEPES, 0.1% human urine, 0.1% L-glutamine, 10 U/mL penicillin and 10 µg/mL streptomycin (GIBCO Invitrogen), and 10% sodium bicarbonate. Promastigote

cultures were incubated at 24°C in 25-cm<sup>2</sup> flasks. All parasites were from cultures that were serially passaged for less than 5 weeks.

## **2.2. Quercetin**

Quercetin at 95% purity was purchased from Acros (Fair Lawn, NJ, USA) and a stock solution (1500mM) was prepared using Phosphate-buffered saline (PBS) with 2% dimetilsufoxide (DMSO) as vehicle. All concentrations (48, 70, 96 and 192 µM) used in experiments were obtained from the dilution of the stock solution previously prepared.

## **2.3. Animals and Ethics Statement**

Female BALB/c mice weighing approximately 25–30 g, aged 6–8 weeks old, were obtained from the Institute Carlos Chagas-Fiocruz, Curitiba-PR, Brazil. Mice were kept under pathogen-free conditions and used according to protocols approved by the Institutional Animal Care and Use Committee. This work was approved by the Londrina State University – Ethics Committee for Animal Experimentation (33064.2012.42)

## **2.4. Evaluation of antipromastigote effect**

Stationary phase of *L. braziliensis* promastigote forms at concentration of  $1 \times 10^6$  per well were placed in 24 well microplates and treated with different concentrations of quercetin (48, 70, 96 and 192 µM) or with quercetin vehicle (2% DMSO) at 1000µL final volume/well. Viable promastigotes were counted in a Neubauer chamber after 24, 48, 72 and 96 h of treatment. In the control, only culture medium was used.

## 2.5. Viability of peritoneal macrophages

The viability of peritoneal macrophages treated with quercetin was evaluated using the 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assay as previously described (Mosmann, 1983). Peritoneal macrophages from BALB/c mice ( $5 \times 10^5/\text{mL}$ ) were obtained by injection of 3 mL of RPMI 1640 culture medium (GIBCO) supplemented with 10% fetal bovine serum (GIBCO) into the peritoneal cavity. Macrophages were recovered, cultured in 24-well plates and preincubated with 200  $\mu\text{L}$  of RPMI 1640 medium for 2 h for adherence at  $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ . The adherent cells were then incubated with quercetin (48, 70, 96 and  $192\mu\text{M}$ ) or with quercetin vehicle (2% DMSO) and maintained in culture for 24h at  $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ . Thereafter, the culture was washed with PBS and added 500 $\mu\text{L}$  of MTT, followed by incubation for an additional 4h at  $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ . The MTT formazan product was diluted with 300 $\mu\text{L}$  of DMSO, transferring to 96-well plates and measured in a spectrophotometer with absorbance determined at 550nm. The results were expressed as percentage MTT reduction relative to the control group calculated as the following formula:

$$(\text{viable macrophages})\% = (\text{OD of drug-treated sample}/\text{OD of untreated sample}) \times 100.$$

## 2.6. Phagocytic assays

Peritoneal macrophages ( $5 \times 10^5/\text{mL}$ ) were cultured in 24-well plates containing 13-mm diameter glass coverslips and preincubated with 200  $\mu\text{L}$  of RPMI 1640 medium for 2 h for adherence at  $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ . Adherent macrophages were infected with promastigote forms (5:1) for 2 h. After infection, free promastigotes were removed by washing with PBS, and the infected cells were treated with quercetin (48 or 70  $\mu\text{M}$ ), vehicle or with RPMI 1640 alone (control) and incubated for 24h at  $37^\circ\text{C}/5\% \text{CO}_2$ . Cells were stained with Giemsa and 20 fields analyzed using a light microscope (magnification of 1000x -Olympus optical Co., Ltd., Tokyo, Japan. model CX31RBSFA) to determine the phagocytic index by means of %

of infection and parasites/macrophage number. The supernatant was collected to determine cytokine, nitrite and iron contents.

## **2.7. Promastigote recovery assay**

Promastigote recovery assay was performed as previously described by Silva et al (2013). Briefly, peritoneal macrophages were infected with *L. braziliensis* and treated with quercetin in the same conditions as described in the phagocytic assay method. After the treatment with quercetin (24h), the culture was washed with PBS and incubated with 199 culture medium at 24°C in order to induce the differentiation of amastigote intracellular into promastigote forms. Recovered promastigotes were counted in a Neubauer chamber daily for 5 days.

## **2.8. Cytokine determination**

Supernatants of phagocytic assay were collected 24h post quercetin treatment, centrifuged at 460 g at 4°C for 7 min, and stored at -80°C for cytokine determination. Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ), interleukin (IL)-1 $\beta$ , IL-10, interferon-gamma (IFN- $\gamma$ ) and IL-12 (p70) were determined by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA), according to the manufacturer's instructions (eBiosciences®, USA). Plates were read at 450 nm using an ELISA plate reader (Thermo Plate—TP-Reader).

## **2.9. Determination of nitrite levels as estimation of nitric oxide (NO)**

Production of nitric oxide (NO $\cdot$ ) was determined by measuring the level of accumulated nitrite, a metabolite of NO $\cdot$  in the culture supernatant using Griess reagent

(Sigma-Aldrich). After 24 h of treatment with Quercetin, the culture supernatants were collected and mixed with an equal volume of Griess reagent in 96-well culture plates and incubated at room temperature for 10 min. The absorbance was measured at 540 nm and nitrite concentrations were calculated by reference to a standard curve generated by known concentrations of sodium nitrite.

## **2.10. Determination of labile iron concentration and total bound iron**

The determination of labile iron concentration in supernatants of phagocytic assay was performed utilizing the Dimension® automated system. The method is an adaptation of the direct assay for iron, developed by Smith et al (1984) and is required the Flex® reagent cartridge for implementing the test. The dispensation, shaking and processing of the samples are automatically performed by the Dimension® system. Briefly, in acidic conditions (pH 4.5) and in the presence of a reducing agent (ascorbic acid) occurs the release of iron bound to transferrin. The resulting product ( $\text{Fe}^{2+}$ ) forms a blue complex with 3-(2-pyridyl)-5,6-bis-(5-furyl sulfonic acid)-1,2,4-triazine (Ferene®). The absorbance of the complex is measured using a bichromatic endpoint technique (600, 700nm). The test principle for the total bound iron is similar, the samples is automatically mixed with a serum iron solution to saturate all available sites of iron binding in transferrin. In non-acidic conditions (pH 8.6), only saturated iron in excess, unbound, is available to be reduced to ferric iron by ascorbic acid and form the blue complex with Ferene®. The subsequent addition of acid (pH 4.5) releases the iron bound to transferrin, this supplemental iron is reduced to ferric iron by ascorbic acid, forming an increased amount of blue complex with Ferene®. The increase in absorbance during the change of pH 8.6 to pH 4.5 is proportional to the concentration of iron bound to transferrin.

## 2.11. Immunocytochemical assays

Immunocytochemical assays for nuclear factor erythroid 2-related factor 2 (NRF2) and inducible nitric oxide synthase (iNOS), were performed on coverslip-adherent cells (cells prepared as in the protocol for phagocytic assay) using the labeled streptavidin-biotin method (Universal Dako LSAB®+kit; DAKO Japan, Kyoto, Japan) without microwave pretreatment. The coverslips were incubated with 10% Triton X-100 for 1 h, washed 3 times in PBS and treated for 40 min at room temperature with 10% BSA. Next, coverslips were incubated overnight at 4°C with the primary antibody (anti-NRF2, and anti-iNOS rabbit polyclonal antibody diluted 1:300, Santa Cruz Biotechnology). After secondary antibody treatment (Biotinylated anti-rabbit, anti-mouse and anti-goat immunoglobulins, LSAB+System-HRP, DAKO, Japan, Kyoto, Japan) for 2 h, at room temperature, horseradish peroxidase activity was visualized by incubation with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and 3,3'-diaminobenzidine (DAB) for 5 min. In the last step, the cells were weakly counterstained with Harry's hematoxylin (Merck). For each case, negative controls were performed by omitting the primary antibody. Intensity and localization of immunoreactivity against the primary antibody used were determined on all coverslips using a photomicroscope (Olympus BX41, Olympus Optical Co., Ltd., Tokyo, Japan). For image analysis, color microphotographs of representative areas (magnification of 400x) were digitally acquired. For semi-quantitative scoring, images were evaluated by using the color deconvolution tool in the ImageJ software (NIH, USA). Pixels were categorized as previously described by Chatterjee et al (2013) as strong positive (3+), positive (2+), weak positive (1+) and negative (0).

## 2.12. Statistical Analysis

Analyses were performed as triplicate datasets, from 3 independent experiments. Results were analyzed as mean  $\pm$  standard error of the mean. Data were analyzed using Prism GraphPad (GraphPad Software, Inc., USA, 5.00). Significant differences between treatments were determined by Student's t-test or ANOVA followed by Tukey's test for multiple comparisons. Differences were considered statistically significant when  $p < 0.05$ . p-values were denoted using the following symbols: (\*\*\*,  $p < 0.001$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*,  $p < 0.05$ ).

## 3. Results

### 3.1. Quercetin inhibited growth of *L. braziliensis* promastigote forms

To evaluate the antipromastigote activity of quercetin, we performed a growth kinetics assay on *L. braziliensis* promastigotes by using different concentrations of the compound (48, 70, 96 and 192 $\mu$ M) for 24, 48, 72 and 96h of treatment. Quercetin significantly inhibited the growth of promastigotes at all times and concentrations tested (Fig. 1A). The vehicle showed no leishmanicidal effect. Both 48 and 70 $\mu$ M significantly inhibited the growth of promastigote forms after 24h of treatment and this effect did not change with time. The higher concentrations (96 and 192 $\mu$ M) were also able to significantly inhibit the growth of the parasites, however, their effects were dose and time-dependent.

In order to evaluate if quercetin exerts cytotoxic effect in peritoneal macrophages, we conducted a MTT assay as shown in Figure 1B. The results showed that treatments with 48 and 70 $\mu$ M quercetin did not alter the viability of murine peritoneal macrophages, in contrast, 96 and 192 $\mu$ M presented reduction in the viability of the cells.

For the subsequent experiments, we chose the two lowest concentrations of quercetin that showed a leishmanicidal effect (48 and 70  $\mu\text{M}$ ). This choice was made to avoid cytotoxic effects of quercetin on peritoneal macrophages

### **3.2. Phagocytic index was reduced, as well the number of amastigotes per macrophage and recovered promastigotes**

We performed a phagocytic assay to determine the leishmanicidal effect of quercetin on *L. braziliensis*-infected macrophages. BALB/c peritoneal macrophages were plated and challenged with *L. braziliensis*. After 2h of infection, the culture was washed to remove free promastigotes and the infected macrophages were treated with 48 or 70 $\mu\text{M}$  of quercetin for 24h.

The results showed that after 24h of treatment, both concentrations of quercetin significantly reduced the percentage of infection in macrophages (Fig. 2A). The percentage of reduction was 40.77% and 21,9% for 48 and 70 $\mu\text{M}$  respectively. Furthermore, both concentrations of quercetin significantly decreased the mean number of amastigotes per macrophage compared to control (Fig. 2B).

To confirm the capacity of quercetin to enhance the elimination of intracellular parasites, we performed a promastigote recovery assay. After quercetin 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 daily for 5 days. Decreased number of parasites was observed when infected macrophages were treated with either 48 or 70 $\mu\text{M}$  of quercetin for 24h reducing 51.4 and 54.5% of parasites at day 5, respectively when compared to control (Fig. 2C).

### **3.3. Quercetin treatment did not modulate cytokines, iNOS and NO levels**

Macrophages are the most important cell involved on *Leishmania*-immune response and the production of cytokines like IL-12, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  may together result in the activation of this cell, increasing the expression of inducible NO synthase (iNOS), which catalyzes the production of a huge amount of nitric oxide (NO), an important molecule for eliminating *Leishmania* spp. (Van Assche et al., 2011).

In attempt to determine if quercetin acted as an immunomodulator to enhance macrophage microbicidal activity, we evaluated the cytokine profile of infected macrophages treated with quercetin for 24h. Our results showed that treatment of quercetin did not modulate the levels of IL-10, IL-1  $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$  and IL-12p70 of *L. braziliensis*-infected macrophages (Fig. 3A, B, C, D, E).

When evaluated the NO production, we measured iNOS expression (Fig. 3G) and nitrite levels (Fig 3F). Our results corroborated with cytokine profile and showed that infected macrophages treated with quercetin for 24h produced the same levels of NO and did not change iNOS expression compared to control group.

This data suggested that quercetin acts controlling the infection without triggering the increase of cytokine, iNOS and NO levels. In this way, the results prompted us to investigate how this compound exerts its microbicidal activity on *L. braziliensis*-infected macrophages.

Both concentrations used until here showed similar results in all experiments conducted, therefore, to continue the investigation, we utilized only quercetin at 48 $\mu$ M because it was the lowest concentration that was effective in reducing infection rate.

### **3.4. Labile iron concentration was decreased and iron bound to transferrin increased**

Iron is a co-factor for several essential enzymes and biochemical pathways, including those required for metabolic activity, growth and replication of *Leishmania* in macrophages. (Marquis and Gros, 2007). Previous works have demonstrated that depletion of labile iron is a good strategy against parasitic infections (Weinberg, 1999; Breidbach et al., 2002). Taking into account that quercetin is able to act as an iron chelator (Leopoldini et al., 2006), we determined the effect of quercetin on iron metabolism. The results showed that treatment with quercetin of *L. braziliensis*-infected macrophages decreased the labile iron concentration (Fig. 4A) and increased iron bound to transferrin (Fig 4B) when compared to control.

### **3.5. Quercetin Upregulated nuclear factor erythroid 2-related factor (NRF2) expression**

Besides the chelating property of this flavonoid, previous studies have demonstrated the effect of quercetin on NRF2-increased expression, a key regulator of the antioxidant response which plays a central role in up regulation of multiple genes, including ferritin and ferroportin involved in iron metabolism (Lee et al., 2015; Yasui et al., 2015; Piestch et al. 2003; Gorrini et al., 2013). Therefore, we decided to investigate the NRF2 expression on *L. braziliensis*-infected macrophages treated with quercetin, and we observed that the treatment with 48µM of quercetin significantly upregulated the expression of NRF2 in infected cells (Fig. 5).

## **4. Discussion**

Parasites of the genus *Leishmania* are initially recognized by phagocytic cells, and macrophages thereby play an important role in controlling infection and eliminating these

intracellular microorganisms. The resolution of the disease is dependent on the immune response triggered in the host as well as the microbicidal activity of the drug used in the chemotherapy. Despite that activated macrophages have potent microbicidal mechanisms, parasites of the genus *Leishmania* show several virulence factors and are capable of escaping immune responses creating a favorable conditions for proliferation (Olivier et al., 2012). Additionally, the current available treatment against leishmaniasis is based on a highly toxic chemotherapy using mainly pentavalent antimonials (Alvar et al., 2006). Therefore, there has been an extensive search for new therapeutic strategies, and natural compounds have received much attention.

The present study investigated the *in vitro* effect of quercetin on *L. braziliensis*-infected macrophages, and suggested the role of NRF2 together with iron chelating feature of quercetin as a mechanism involved in infection control. Previous studies demonstrated that quercetin interacts with *L. braziliensis* promastigote forms and has antileishmanial activity, however, quercetin effect on *L. braziliensis*-infected macrophages still remained unknown (Marín et al., 2009; Gundampati et al., 2014).

Our results reinforce antileishmanial effect of quercetin and showed that all tested concentrations were able to inhibit the growth of *L. braziliensis* promastigote forms after 24h of treatment. In order to continue the tests, we verified the cytotoxicity of quercetin on BALB/c peritoneal macrophages. In concordance with a previous published study (Liao and Lin, 2014), we verified that quercetin 48 and 70 $\mu$ M were not toxic to BALB/c peritoneal macrophages. These findings prompted us to continue the evaluation of quercetin in a context of infected macrophages.

Despite the strategies used by macrophages to control infection, these parasites have various escape mechanisms that allow the establishment of the protozoan and the differentiation of the promastigote into the amastigote form (Awasthi et al., 2004; Rodríguez

et al., 2011), promoting parasite replication. Therefore, we evaluated if the treatment of *L. braziliensis*-infected macrophages with quercetin for 24h was able to control the infection and kill the amastigote forms. The results showed for the first time that quercetin decreased the phagocytic index as well as lowering the mean number of *L. braziliensis* amastigotes per macrophage. In attempt to confirm that quercetin is able to control the infection, we performed a promastigote recovery assay which confirms that quercetin treatment is effective to control *L. braziliensis* infection.

Quercetin has been described as a compound that acts through multiple mechanisms against *Leishmania* parasites (Mittra et al., 2000; Sen et al., 2008; Fonseca-Silva F et al., 2011; da Silva et al., 2012). Since quercetin showed a killing effect on *L. braziliensis*, we investigated the potential mechanisms involved in amastigote elimination.

Cutaneous *Leishmania major* infection in mice is a well-established model to study intracellular defense mechanisms which demonstrated the central role of iNOS activation and NO synthesis in the resolution of the infection (Olekhnovitch et al., 2014).

iNOS induction is a tightly process regulated mainly by cytokines like IFN- $\gamma$  TNF- $\alpha$  IL-1B which activate macrophages and trigger the NO production to eliminate the parasites (Liew et al., 1990; Xie et al., 1993; Lima-Junior et al., 2013).

Therefore, we evaluated the cytokine profile, iNOs expression and NO levels of *L. braziliensis*-infected macrophages after quercetin treatment, aiming to determine if the microbicidal mechanism involved was mediated by this classical pathway. Our results showed that quercetin did modulate neither cytokines nor NO-axis, suggesting that the mechanism involved in *L. braziliensis* elimination was independent by these mediators. Although cytokines and NO axis are important molecules involved in host outcome against leishmaniasis and responsible for enhancing the microbicidal activity of macrophages (Heinzel et al., 1991; De Oliveira and Brodskyn, 2012), previously study have demonstrated

that proinflammatory responses contributes to pathogenesis during experimental leishmaniasis, impairing the outcome of disease, then it is important that quercetin be able to control infection without triggering inflammatory responses (Carneiro et al., 2015).

Iron is a key regulator of cellular metabolism, which makes iron acquisition an essential mechanism of the biology of pathogens. The success or failure of iron uptake by the pathogen impacts the outcome of pathogenesis and is an important process in infection control (Weinberg, 1986). Considering that, iron deprivation could be an effective strategy for controlling leishmanial infection (Soteriadou et al., 1995; Malafaia et al., 2011; Rafiee et al., 2014). A recent work showed that *L. donovani* uses only the labile iron pool for its survival and replication (Das et al., 2009), however, no studies have evaluated the importance of iron availability on *L. braziliensis*-infected macrophages. Accordingly, we evaluated iron concentration in infected macrophages treated with quercetin and have demonstrated that quercetin treatment was able to decreased the labile iron pool and increased iron bound to transferrin, which impaired the acquisition of iron by the parasite. These results are in concordance with previous work that demonstrated the capacity of quercetin to gain access to the cytosol, to shuttle labile iron and to transfer the metal to transferrin (Baccan et al., 2012).

Antioxidants, such as quercetin, can have a pathogen neutralizing action, directly by scavenging ROS or indirectly by activating pathways that promote ROS degradation (Paiva and Bozza, 2014). A pivotal factor that regulates the antioxidant responses in a variety of disease models is the transcription factor NRF2. Nrf2 is responsible for regulating a battery of antioxidant and cellular protective genes, primarily in response to oxidative stress and also genes that contain ARE motifs, such as H-ferritin and ferroportin, both responsible for controlling the labile iron pool of the cell (Hintze and Theil, 2005; Marro et al., 2010; Shelton and Jaiswal, 2013). Paiva et al. (2012) showed that antioxidant defenses such as activation of NRF2 and heme-oxygenase-1 (HO-1) decrease parasitism by

*Trypanosoma cruzi* in mice which was counterbalanced by the addition of iron sulfate. Another study has demonstrated that NRF2-activator resveratrol was able to reduce *Leishmania major* burden in macrophages, showing that antioxidant defense helps macrophages to eliminate the parasite (Kedzierski et al., 2007). Knowing that quercetin is an antioxidant able to activate NRF2 (Balstad et al., 2011), we determined NRF2 expression in *L. braziliensis*-infected macrophages by immunocytochemical detection to know if treatment with quercetin increased its levels. Our results demonstrated for the first time that quercetin treatment increased the expression of NRF2 in *L. braziliensis*-infected macrophages. It is important to take note that the labeling was localized at cell nucleus, indicating that NRF2 was active. Taking all these results together, we demonstrated that besides quercetin acts as an iron chelator, it was able to upregulated NRF2 expression, which massively stimulate the transcription of proteins responsible for controlling the bioavailability of labile iron pool, impairing the uptake of this metal by the parasite. Therefore, quercetin can interfere with iron metabolism in two ways; directly, by chelating the metal, and indirectly by upregulating NRF2 expression.

In conclusion, quercetin showed substantial *in vitro* antileishmanial activity in *L. braziliensis*-infected macrophages without triggering a proinflammatory and prooxidant response. Our data indicated that the mechanism by which quercetin exerts its antileishmanial effects involves its capacity to activate antioxidant responses mediated by NRF2, followed by a modulation of the labile iron pool, which culminates in a depletion of available iron for *L. braziliensis* replication and survival within macrophages.

## **5. Acknowledgments**

This work was financially supported by Fundação Araucária (24/2012), Conselho Nacional de Desenvolvimento e Pesquisa (CNPq: 482195/2013-4), Coordenação de

Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) and State University of Londrina. The authors would like to acknowledge Dr. Juliano Bordignon for supplying the animals. Dr. A. Leyva helped with English editing of the manuscript.

## 6. Conflict of interest

The authors declared that there is no conflict of interest.

## 7. References

- Alvar, J., Croft, S., Olliaro, P., 2006. Chemotherapy in the treatment and control of leishmaniasis. *Adv Parasitol.* 61:223-274.
- Alves-Ferreira, E.V.C., Toledo, J.S., De Oliveira, A.H.C., Ferreira, T.R., Ruy, P.C., Pinzan, C.F., Santos, R.F., Boaventura, V., Rojo, D., López-González, A., Rosa, J.C., Barbas, C., Barral-Netto, M., Barral, A., Cruz, A.K., 2015. Differential Gene Expression and Infection Profiles of Cutaneous and Mucosal *Leishmania braziliensis* Isolates from the Same Patient. *PLoS Negl Trop Dis* 9(9): e0004018. doi: 10.1371/journal.pntd.0004018.
- Awasthi, A., Mathur, R.K., Saha, B., 2004. Immune response to *Leishmania* infection. *Indian J Med Res.* 119:238-258.
- Baccan, M.M., Chiarelli-Neto, O., Pereira, R.M., Espósito, B.P., 2012. Quercetin as a shuttle for labile iron. *J Inorg Biochem.* 10734-39.
- Balaña-Fouce, R., Reguera, R.M., Cubría, J.C., Ordóñez, D., 1998. The Pharmacology of Leishmaniasis. *Gen Pharmacol.* 30:435-443.
- Balstad, T.R., Carlsen, H., Myhrstad, M.C., Kolberg, M., Reiersen, H., Gilen, L., Ebihara, K., Paur, I., Blomhoff, R., 2011. Coffee, broccoli and spices are strong inducers of electrophile

response element-dependent transcription in vitro and in vivo – Studies in electrophile response element transgenic mice. *Mol Nutr Food Res.* 55:185–197.

Boots, A.W., Wilms, L.C., Swennen, E.L., Kleinjans, J.C., Bast, A., Haenen, G.R., 2008. In vitro and ex vivo anti-inflammatory activity of quercetin in healthy volunteers. *Nutrition.* 24:703-10

Breidbach, T., Scory, S., Krauth-Siegel, R.L., Steverding, D., 2002. Growth inhibition of bloodstream forms of *Trypanosoma brucei* by the iron chelator deferoxamine. *Int J Parasitol.* 32:473-479.

Carneiro, M.B., Lopes, M.E., Vaz, L.G., Sousa, L.M., Santos, L.M., Souza, C.C., Campos, A.C., Gomes, D.A., Gonçalves, R., Tafuri, W.L., Vieira, L.Q., 2015. IFN- $\gamma$ -Dependent Recruitment of CD4<sup>+</sup> T Cells and Macrophages Contributes to Pathogenesis During *Leishmania amazonensis* Infection. *J Interferon Cytokine Res.* Ahead of print. doi:10.1089/jir.2015.0043.

Chan, S.T., Yang, N.C., Huang, C.S., Liao, J.W., Yeh, S.L., 2013. Quercetin Enhances the Antitumor Activity of Trichostatin A through Upregulation of p53 Protein Expression In Vitro and In Vivo. *PLoS ONE* 8(1): e54255. doi: 10.1371/journal.pone.0054255

Chatterjee, S., Malhotra, R., Varghese, F., Bukhari, A.B., Patil, A., Budrukkar, A., Parmar, V., Gupta, S., De A., 2013. Quantitative immunohistochemical analysis reveals association between sodium iodide symporter and estrogen receptor expression in breast cancer. *PLoS One* 8(1): e54055. doi: 10.1371/journal.pone.0054055

Chiang, L.C., Chiang, W., Liu, M.C., Lin, C.C., 2003. In vitro antiviral activities of *Caesalpinia pulcherrima* and its related flavonoids. *J Antimicrob Chemother.* 52:194-198.

- Csokay, B., Prajda, N., Weber, G., Olah, E., 1997. Molecular Mechanisms in the antiproliferative action of quercetin. *Life Sci.* 60:2157-2163.
- Da Silva, E.R., Maquiaveli, C.C., Magalhães, P.P., 2012. The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase. *Exp Parasitol.* 130:183-188
- Das, N.K., Biswas, S., Solanki, S., Mukhopadhyay, C.K., 2009. *Leishmania donovani* depletes labile iron pool to exploit iron uptake capacity of macrophage for its intracellular growth. *Cell Microbiol.* 11:83-94
- De Oliveira, C.I., Brodskyn, C. I., 2012. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. *Front Immun.* 3:145. doi: 10.3389/fimmu.2012.00145
- Detoni, M.L., Fessel, M.R., Maia, A.C.R.G., Porcino, G.N., Quellis, L.R., Faria-Pinto, P., Marques, M.J., Juliano, M.A., Juliano, L., Diniz, V.A., Côrte-Real, S., Gonçalves-da-Costa, S.C., Souza, C.S.F., Vasconcelos, E.G., 2013. An antigenic domain of the *Leishmania amazonensis* nucleoside triphosphate diphosphohydrolase (NTPDase 1) is associated with disease progression in susceptible infected mice. *Parasitol Res.* 112:2773-2782
- Fonseca-Silva, F., Inacio, J.D.F., Canto-Cavalheiro, M.M., Almeida-Amaral E.E., 2011. Reactive Oxygen Species Production and Mitochondrial Dysfunction Contribute to Quercetin Induced Death in *Leishmania amazonensis*. *PLoS ONE* 6(2): e14666. doi: 10.1371/journal.pone.0014666
- Gorrini, C., Harris, I.S., Mak, T.W., 2013. Modulation of oxidative stress as an anticancer strategy. *Nat Rev Drug Discov.* 12:931-947.

- Gundampati, R.K., Sahu, S., Shukla, A., Pandey, R.K., Patel, M., Banik, R.M., Jagannadham, M.V., 2014. Tryparedoxin peroxidase of *Leishmania braziliensis*: homology modeling and inhibitory effects of flavonoids for anti-leishmanial activity. *Bioinformation*. 10:353-357.
- Heinzel, F.P., Sadick, M.D., Mutha, S.S., Locksley, R.M., 1991. Production of interferon gamma, interleukin 2, interleukin 4, and interleukin 10 by CD4+ lymphocytes in vivo during healing and progressive murine leishmaniasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 88:7011-7015.
- Herwaldt, B.L., 1999. Leishmaniasis. *Lancet*. 354:1191-1199.
- Hintze, K.J., Theil, E.C., 2005. DNA and mRNA elements with complementary responses to hemin, antioxidant inducers, and iron control ferritin-L expression. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:15048-15052.
- Kedzierski, L., Curtis, J.M., Kaminska, M., Jodynis-Liebert, J., Murias, M., 2007. In vitro antileishmanial activity of resveratrol and its hydroxylated analogues against *Leishmania major* promastigotes and amastigotes. *Parasitol Res*. 102:91-97.
- Lee, Y.J., Lee, D.M., Lee, S.H., 2015. Nrf2 Expression and Apoptosis in Quercetin-treated Malignant Mesothelioma Cells. *Mol Cells*. 38:416-425.
- Leopoldini, M., Russo, N., Chiodo, S., Toscano, M., 2006. Iron chelation by the powerful antioxidant flavonoid quercetin. *J Agric Food Chem*. 54:6343-6351.
- Liao, Y.R., Lin, J.Y., 2014. Quercetin, but not its metabolite quercetin-3-glucuronide, exerts prophylactic immunostimulatory activity and therapeutic antiinflammatory effects on lipopolysaccharide-treated mouse peritoneal macrophages ex vivo. *J Agric Food Chem*. 62:2872-2880.

Liew, F.Y., Li, Y., Millott, S., 1990. Tumor necrosis factor-alpha synergizes with IFN- $\gamma$  in mediating killing of *Leishmania major* through the induction of nitric oxide. *J Immunol.* 145:4306–4310.

Lima-Junior, D.S., Costa, D.L., Carregaro, V., Cunha, L.D., Silva, A.L., Mineo, T.W., Gutierrez, F.R., Bellio, M., Bortoluci, K.R., Flavell, R.A., Bozza, M.T., Silva, J.S., Zamboni, D.S., 2013. Inflammasome-derived IL-1 $\beta$  production induces nitric oxide-mediated resistance to *Leishmania*. 19:909-915.

Lye, L.F., Owens, K., Shi, H., Murta, S.M., Vieira, A.C., Turco, S.J., Tschudi, C., Ullu, E., Beverley, S.M., 2010. Retention and loss of RNA interference pathways in trypanosomatid protozoans. *PLoS Pathog* 6(10): e1001161. doi: 10.1371/journal.ppat.1001161

Maciel-Rezende, C.M., Almeida, L., Costa, E.D., Pires, F.R., Alves, K.F., Junior, C.V., Dias, D.F., Doriguetto, A.C., Marques, M.J., Santos, M.H., 2013. Synthesis and biological evaluation against *Leishmania amazonensis* of a series of alkyl-substituted benzophenones. *Bioorg Med Chem.* 21:3114-3119.

Malafaia, G., Marcon, L.N., Pereira, L.F., Pedrosa, M.L., Rezende, S.A., 2011. *Leishmania chagasi*: Effect of the iron deficiency on the infection in BALB/c mice. *Exp Parasitol.* 127:719-723.

Mamani-Matsuda, M., Rambert, J., Malvy, D., Lejoly-Boisseau, H., Dulouède, S., Thiolat, D., Coves, S., Courtois, P., Vincendeay, P., Mossalay, M.D., 2004. Quercetin Induces Apoptosis of *Trypanosoma brucei gambiense* and Decreases the Proinflammatory Response of Human Macrophages. *Antimicrob Agents Chemother.* 48:924-929.

Marín, C., Boutaleb-Charki, S., Díaz, J.G., Huertas, O., Rosales, M.J., Pérez-Cordon, G., Guitierrez-Sánchez, R., Sánchez-Moreno, M., 2009. Antileishmaniasis activity of flavonoids from *Consolida oliveriana*. *J Nat Prod.* 72:1069-1074.

Marquis, J.F., Gros, P., 2007. Intracellular *Leishmania*: your iron or mine? *Trends Microbiol.* 15:93-95.

Marro, S., Chiabrand, D., Messana, E., Stolte, J., Turco, E., Tolosano, E., Muckenthaler, M.U., 2010. Heme controls ferroportin1 (FPN1) transcription involving Bach1, Nrf2 and a MARE/ARE sequence motif at position -7007 of the FPN1 promoter. 2010. 95:1261-1268.

Mears, E.R., Modabber, F., Don, R., Johnson, G.E., 2015. A Review: The Current In Vivo Models for the Discovery and Utility of New Anti-leishmanial Drugs Targeting Cutaneous Leishmaniasis. *PLoS Negl Trop Dis* 9(9): e0003889. doi: 10.1371/journal.pntd.0003889

Mitra, B., Saha, A., Chowdhury, A.R., Pal, C., Mandal, S., Mukhopadhyay, S., Bandyopadhyay, S., Majumder, H.K., 2000. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. *Mol Med.* 6:527-541.

Mosmann, T., 1983. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. *J Immunol Methods.* 65:55-63.

Murray, H.W., Berman, J.D., Davies, C.R., Saravia, N.G., 2005. Advances in Leishmaniasis. *Lancet.* 366:1561-1577

Olekhovitch, R., Ryffel, B., Müller, A.J., Bousso, P., 2014. Collective nitric oxide production provides tissue-wide immunity during *Leishmania* infection. *J Clin Invest.* 124:1711-1722.

- Olivier M., Atayde, V.D., Isnard, A., Hassani, K., Shio, M.T., 2012. *Leishmania* virulence factors: focus on the metalloprotease GP63. *Microbes Infect.* 14:1377-1389.
- Paiva, C.N., Bozza, M.T., 2014. Are Reactive Oxygen Species Always Detrimental to Pathogens? *Antioxid Redox Signal.* 20:1000–1037.
- Paiva, C.N., Feijó, D.F., Dutra, F.F., Carneiro, V.C., Freitas, G.B., Alves, L.S., Mesquita, J., Fortes, G.B., Figueiredo, R.T., Souza, H.S., Fantappié, M.R., Lannes-Vieira, J., Bozza, M.T., 2012. Oxidative stress fuels *Trypanosoma cruzi* infection in mice. *J Clin Invest.* 122:2531-2542.
- Panis, C., Herrera, A.C., Victorino, V.J., Campos, F.C., Freitas, L.F., De Rossi, T., Colado-Simão, A.N., Cecchini, A.L., Cecchini, R., 2012. Oxidative stress and hematological profiles of advanced breast cancer patients subjected to paclitaxel or doxorubicin chemotherapy. *Breast Cancer Res Treat.* 133:89-97.
- Peacock, C.S., Seeger, K., Harris, D., Murphy, L., Ruiz, J.C., Quail, M.A., Peters, N., Adlem, E., Tivey, A., Aslett, M., Kerhornou, A., Ivens, A., Fraser, A., Rajandream, M.A., Carver, T., Norbertczak, H., Chillingworth, T., Hance, Z., Jagels, K., Moule, S., Ormond, D., Rutter, S., Squares, R., Whitehead, S., Rabbinowitsch, E., Arrowsmith, C., White, B., Thurston, S., Bringaud, F., Baldauf, S.L., Faulconbridge, A., Jeffares, D., Depledge, D.P., Oyola, S.O., Hilley, J.D., Brito, L.O., Tosi, L.R., Barrell, B., Cruz, A.K., Mottram, J.C., Smith, D.F., Berriman, M., 2007. Comparative genomic analysis of three *Leishmania* species that cause diverse human disease. *Nat. Genet.* 39:839-847.
- Pietsch, E.C., Chan, J.Y., Torti, F.M., Torti, S.V., 2003. Nrf2 mediates the induction of ferritin H in response to xenobiotics and cancer chemopreventive dithiolethiones. *J Biol Chem.* 278:2361-2369.

- Puupponen-Pimiä, R., Nohynek, L., Meier, C., Kähkönen, M., Heinonen, M., Hopia, A., Oksman-Caldentey, K.M., 2001. Antimicrobial properties of phenolic compounds from berries. *J Appl Microbiol.* 90:494-507.
- Rafiee, A., Riazi-Rad, F., Darabi, H., Khaze, V., Javadian, S., Ajdary, S., Bahrami, F., Alimohammadian, M.H., 2014. Ferroportin-encapsulated nanoparticles reduce infection and improve immunity in mice infected with *Leishmania major*. *Int J Pharm.* 466:375-381.
- Rath, S., Trivelin, L.A., Imbrunito, T.R., Tomazela, D.M., Jesús, M.N., Marzal, P.C., Junior, H.F.A., Tempone, A.G., 2003. Antimonials employed in the treatment of leishmaniasis: the state of the art. *Quim Nova.* 26:550-555.
- Reithinger, R., Dujardin, J.C., Louzir, H., Pirmez, C., Alexander, B., Brooker, S., 2007. Cutaneous Leishmaniasis. *Lancet Infect. Dis.* 7:p581-596
- Rodrigues, A.M., Hueb, M., Santos, T.A.R.R., Fontes, C.J.F., 2006. Factors associated with treatment failure of cutaneous leishmaniasis with meglumine antimoniate. *Rev Soc Bras Med Trop.* 39:139-145.
- Rodríguez, N.E., Gaur Dixit, U., Allen, L.A., Wilson, M.E., 2011. Stage-specific pathways of *Leishmania infantum chagasi* entry and phagosome maturation in macrophages. *PLoS ONE* 6(4): e19000. doi: 10.1371/journal.pone.0019000
- Sen, G., Mukhopadhyay, S., Ray, M., Biswas, T., 2008. Quercetin interferes with iron metabolism in *Leishmania donovani* and targets ribonucleotide reductase to exert leishmanicidal activity. *J Antimicrob Chemother.* 61:1066-1075.
- Shelton, P., Jaiswal, A.K., 2013. The transcription factor NF-E2-related factor 2 (Nrf2): a protooncogene? *FASEB J.* 27:414-423.

Silva, S.S., Thomé, G.S., Cataneo, A.H.D., Miranda, M.M., Felipe, I., Andrade, C.G.T.J., Watanabe, M.A.E., Piana, G.M., Sforcin, J.M., Pavanelli, W.R., Conchon-Costa, I., 2013. Brazilian Propolis Immunomodulatory and Antileishmanial Effects. *Evid Based Complement Alternat Med.* 2013:7

Soteriadou K<sup>1</sup>, Papavassiliou P, Voyiatzaki C, Boelaert J., 1995. Effect of iron chelation on the in-vitro growth of *Leishmania* promastigotes. *J Antimicrob Chemother.* 35:23-29.

Sundar, S., Chakravarty, J., 2014. An update on pharmacotherapy for leishmaniasis. *Expert Opin Pharmacother.* 16:237-252.

Smith, F.E., Herbert, J., Gaudin, J., Hennessy, D.J., Reid, G.R., 1984. Serum iron determination using ferene triazine. *Clin Biochem.* 17:306-310.

Tasdemir, D., Kaiser, M., Brun, R., Yardley, V., Schmidt, T.J., Tosun, F., Rüedi, P., 2006. Antitrypanosomal and Antileishmanial Activities of Flavonoids and Their Analogues: In Vitro, In Vivo, Structure-Activity Relationship, and Quantitative Structure-Activity Relationship Studies. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50:1352–1364.

Van Assche, T., Deschacht, M., da Luz, R.A., Maes, L., Cos, P., 2011. *Leishmania*–macrophage interactions: Insights into the redox biology. *Free Radic Biol Med.* 51:337-351.

Xie, Q.W., Whisnant, R., Nathan, C., 1993. Promoter of the mouse gene encoding calcium-independent nitric oxide synthase confers inducibility by interferon gamma and bacterial lipopolysaccharide. *J Exp Med.* 177:1779–1784.

Yasui, M., Matsushima, M., Omura, A., Mori, K., Ogasawara, N., Kodera, Y., Shiga, M., Ito, K., Kojima, S., Kawabe, T., 2015. The Suppressive Effect of Quercetin on Toll-Like Receptor 7-Mediated Activation in Alveolar Macrophages. *Pharmacology.* 96:201-209.

Weinberg, E.D., 1986. Iron, infection and neoplasia. *Clin Physiol Biochem.* 4:50-60.

Weinberg, E.D., 1999. The Role of Iron In Protozoan and Fungal Infectious Diseases. *J Eukaryot Microbiol.* 46:231-238.

## 8. Figure Legends

**Figure 1 – Effect of quercetin on *L. braziliensis* promastigote growth and viability of peritoneal macrophages treated with quercetin.** (A) Growth kinetics of *L. braziliensis* promastigote forms ( $1 \times 10^6$ ) after treatment with quercetin (48, 70, 96 and  $192\mu\text{M}$ ) or vehicle for 24, 48, 72 and 96h. (B) Peritoneal macrophages ( $5 \times 10^5/\text{well}$ ) of BALB/c mouse were plated in 24-well plates, treated with quercetin (48, 70, 96 and  $192\mu\text{M}$ ) or vehicle and incubated for 24h at  $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$ . RPMI 1640 medium and hydrogen peroxide were used as positive and negative controls, respectively. After quercetin treatment, MTT was added to the culture and read at 550nm. Data represent mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments. (ANOVA followed by Tukey test).

**Figure 2 – Effect of quercetin on *L. braziliensis*-infected macrophages.** Peritoneal macrophages were infected with *L. braziliensis* and treated with quercetin (48 and  $70\mu\text{M}$ ) or vehicle for 24h at  $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$ . RPMI 1640 was used as control. (A) Percentage of infected macrophages; (B) mean number of amastigotes per macrophage; (C) kinetics of recovered promastigote forms. Data represent mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments (ANOVA followed by Tukey test).

**Figure 3 –Cytokines, iNOS and NO levels in infected macrophages treated with quercetin.** Peritoneal macrophages were infected with *L. braziliensis* and treated with quercetin (48 and  $70\mu\text{M}$ ) or vehicle for 24h at  $37^\circ\text{C}/5\%\text{CO}_2$ . RPMI 1640 was used as control. Supernatants were collected after 24h of treatment and evaluated the levels of (A) IL-10; (B) IL-1 $\beta$ ; (C) TNF- $\alpha$ ; (D) IFN- $\gamma$  and (E) IL-12p70 by ELISA. (F) Nitrite levels measured by Griess method and (G) iNOS expression was determined by immunocytochemical scoring.

Data represent mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments (ANOVA followed by Tukey test; Student's t-test).

**Figure 4 – Labile iron concentration and total bound iron in *L. braziliensis*-infected macrophages treated with quercetin.** The determination of labile iron concentration in supernatants was performed utilizing the Dimension® automated system. *L. braziliensis*-infected macrophages treated or not with 48  $\mu$ M quercetin for 24h decreased labile iron concentration (A) and increased total iron bound capacity (B). Data represent mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments (t-student test).

**Figure 5 – Immunocytochemical determination of NRF2 in *L. braziliensis*-infected macrophages treated with quercetin.** Immunocytochemical scoring for NRF2 in *L. braziliensis*-infected macrophages treated or not with 48  $\mu$ M quercetin. Data represent mean  $\pm$  standard deviation of three independent experiments (t-student test).

## 9. Figures

Figure 1.

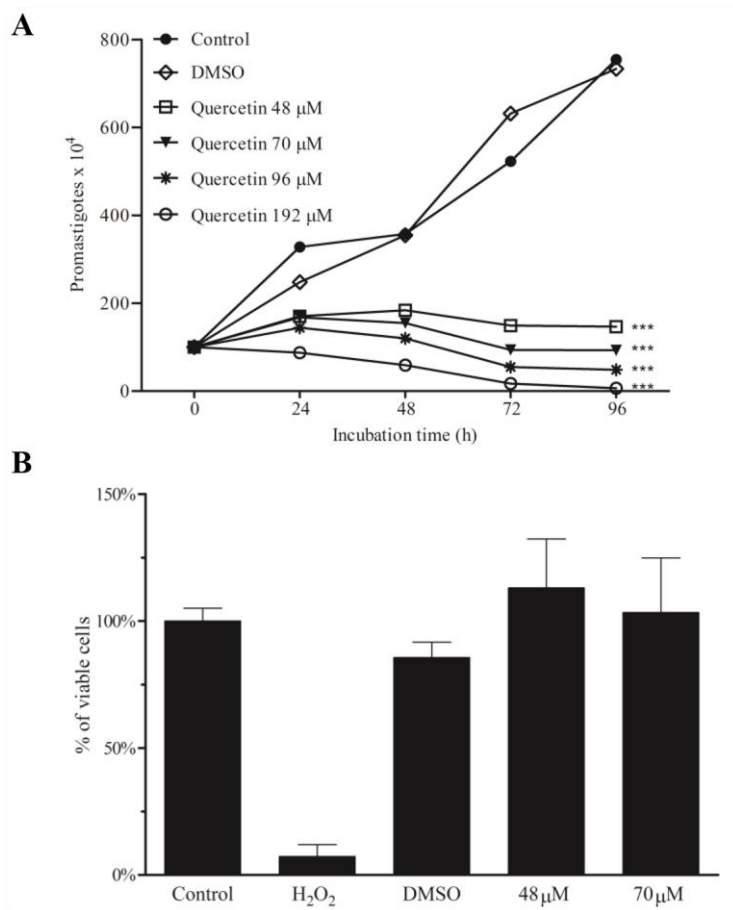


Figure 2.

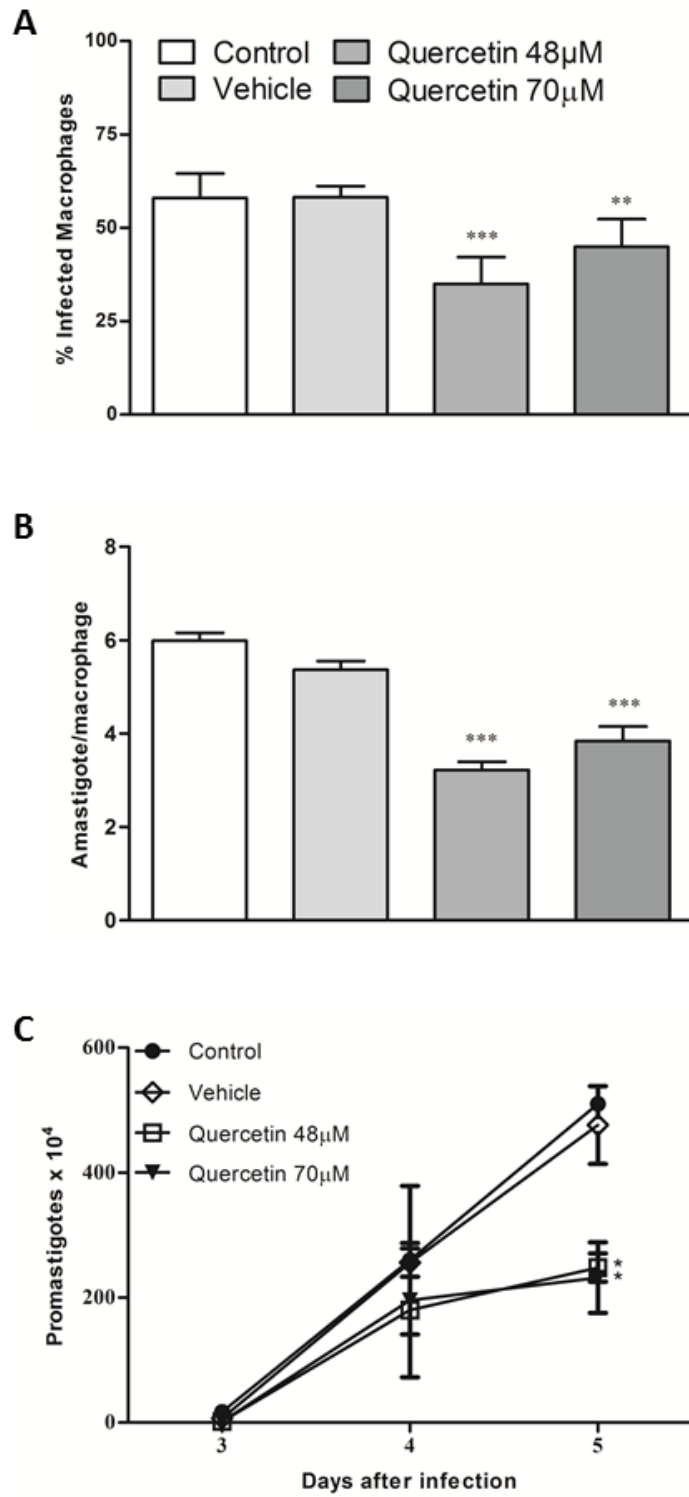


Figure 3.

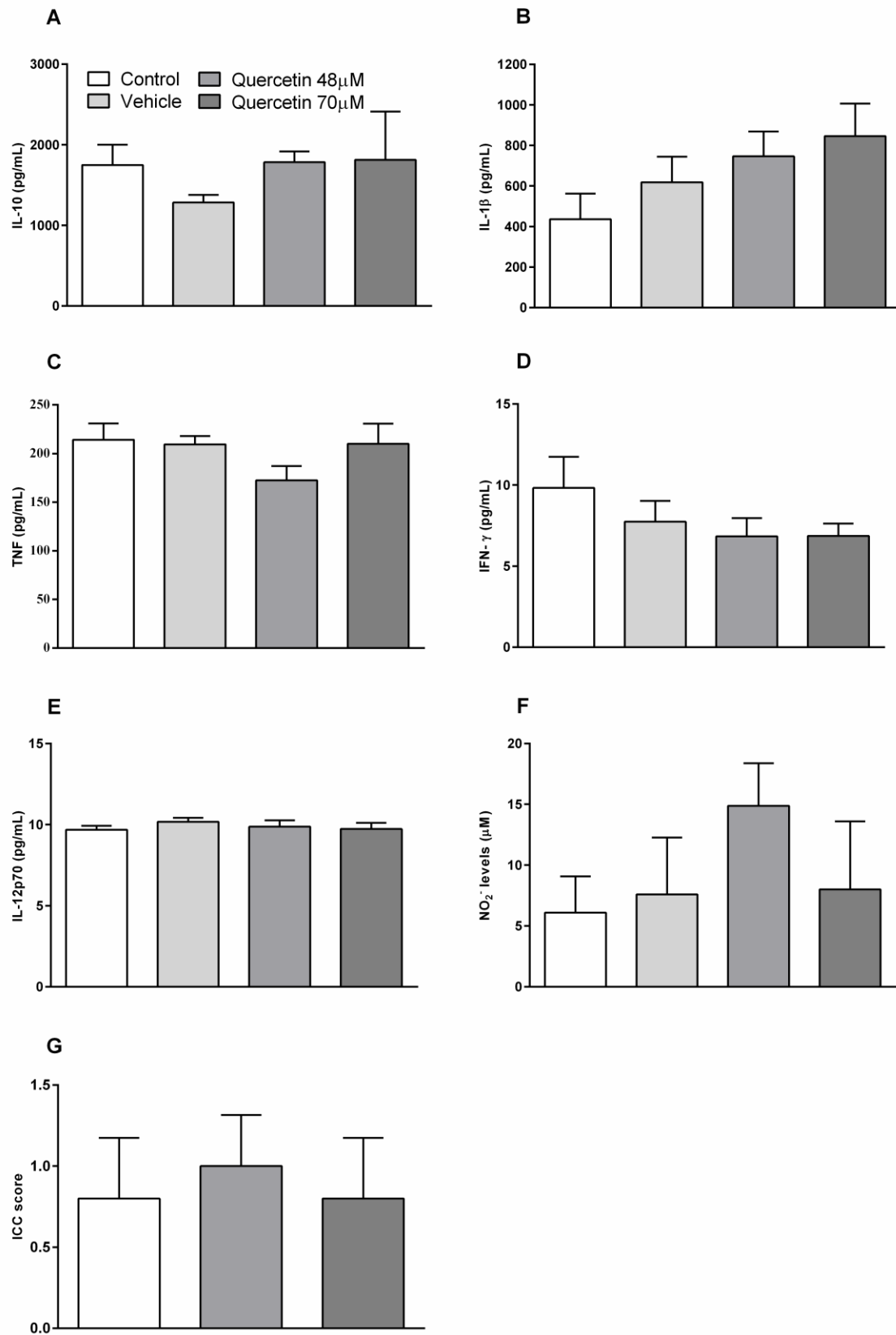
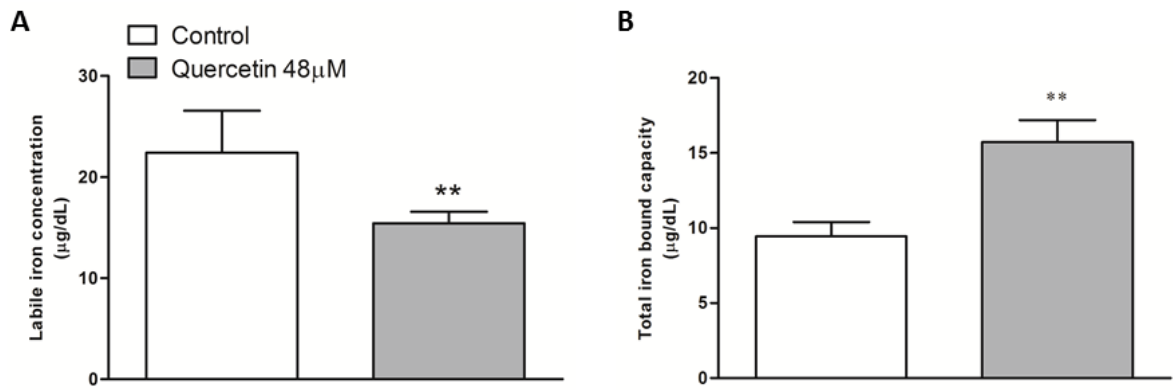
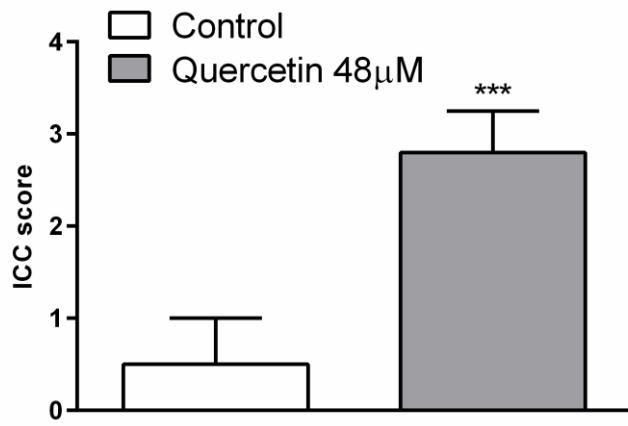


Figure 4.



**Figure 5.**

## 5. ANEXO

### 5.1. Aprovação do Comitê de Ética



Universidade  
Estadual de Londrina

#### COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

OF. CIRC. CEUA N° 49/2013


Londrina, 08 de Março de 2013.

Prezado Pesquisador,

A CEUA/UEL reunida em 19 de Fevereiro de 2013 avaliou o projeto de pesquisa intitulado "Uso de compostos naturais e sintéticos como alternativas terapêuticas para o tratamento da Leishmaniose", processo CEUA n° 33084.2012.42, do Centro de Ciências Biológicas, desenvolvido sob sua responsabilidade. Esclarecidos os aspectos metodológicos solicitados, o projeto de pesquisa está **aprovado** para execução entendendo-se que os princípios éticos postulados pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal estão respeitados.

Serão utilizados 210 camundongos BALB/C com idade de 6 a 8 semanas e peso de 25 gramas, provenientes do Biotério da FIOCRUZ de Curitiba-PR. O projeto tem como objetivo investigar os mecanismos de ação dos compostos naturais e sintéticos na interação parasito/hospedeiro, em busca de encontrar alternativas terapêuticas para a Leishmaniose. Para isto será avaliada a atividade antileishmanicida *in vitro* dos compostos naturais e sintéticos, pelo teste de cultura com formas promastigotas de *Leishmania sp* e pelo teste em cultura de macrófagos de camundongos tratados com os compostos. Também será avaliada atividade antileishmanicida *in vivo*, pela infecção com *Leishmania sp* nos camundongos e tratamento com os compostos em diferentes concentrações. Será realizado o teste de análise de intradermoreação de Montenegro nos camundongos para confirmar a infecção pela *Leishmania sp*. 240 horas após infecção, os animais serão eutanasiados e os órgãos serão coletados para análise da carga parasitária, análise histopatológica, e análise imunohistoquímica para anticorpo anti-NO, anti-CD4 e anti-CD8, o soro será obtido para dosagem de óxido nítrico, dosagem de citocinas IL-4, IL-10, IL-17 e IFN, a determinação da expressão das citocinas também será avaliada por imunoblotting, e os parâmetros de estresse oxidativo como medida da capacidade antioxidante plasmática e quantificação dos níveis de glutatona reduzida das amostras também serão avaliadas. O projeto está previsto para ser desenvolvido em 30 meses após aprovação da CEUA.

Cumpra-se orientar que caso pretendam-se quaisquer alterações no protocolo de aula prática aprovado, deve-se submeter o novo protocolo à apreciação da CEUA/UEL anteriormente à execução das modificações. Sem mais para o momento, subscrevo-me Cordialmente,

  
Prof. Dra. Mirian Silliane Batista de Souza  
Vice-Coordenadora da CEUA-UEL

Ilmo. Sr.

Prof. Dr. Wander Rogério Payanelli

Coordenador do Projeto

Departamento de Ciências Patológicas/Parasitologia

Centro de Ciências Biológicas

Com copia para Sra. Eglê Maria de Sousa (Chefe da DCA/PROPPG) e Diretor (a) do Centro de Ciências Biológicas