

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**ASSOCIAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS E ANFOTERICINA B PARA O
TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL**

Eliane Martins Ferreira Abdias Dias

Uberlândia

Maio, 2018

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**ASSOCIAÇÃO DE PRODUTOS NATURAIS E ANFOTERICINA B PARA O
TRATAMENTO DA LEISHMANIOSE VISCERAL**

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Aluna: Eliane Martins Ferreira Abdias Dias

Orientador: Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva (ICBIM/UFU).

Co-orientadora: Dr^a. Renata Cristina de Paula (ICBIM/UFU).

Uberlândia

Maio, 2018

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

D541a
2018

Dias, Eliane Martins Ferreira Abdias, 1981
Associação de produtos naturais e anfotericina b para o tratamento
da leishmaniose visceral [recurso eletrônico] / Eliane Martins Ferreira
Abdias Dias. - 2018.

Orientador: Sydnei Magno da Silva.

Coorientadora: Renata Cristina de Paula.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,
Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Modo de acesso: Internet.

Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2018.861>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Imunologia. 2. Leishmaniose visceral. 3. Anfotericina b. 4. Doenças parasitárias. I. Silva, Sydnei Magno da, (Orient.). II. Paula, Renata Cristina de, (Coorient.). III. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas. IV. Título.

CDU: 612.017

Angela Aparecida Vicentini Tzi Tziboy – CRB-6/947



Eliane Martins Ferreira Abdias Dias

“Associação de produtos naturais e anfotericina b para o tratamento da leishmaniose visceral”

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia, para a obtenção do título de Mestre.

Área de concentração: Imunologia e Parasitologia Aplicadas.

Banca Examinadora:

Uberlândia, 18 de maio de 2018.

Ceres Luciana Alves
Dra. Ceres Luciana Alves – FAFAR/UFMG

Juliana Silva Miranda
Dra. Juliana Silva Miranda – ICBIM/UFU

Sydney Magno da Silva
Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva (orientador) – ICBIM/UFU

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tudo.

A minha família pelo amor e suporte incondicional em todos os momentos.

Ao meu orientador Prof. Sydnei Magno da Silva e a minha co-orientadora Renata Cristina de Paula por me orientarem durante o mestrado, por toda paciência e empenho, por estarem sempre à disposição quando necessário, tornando possível este trabalho.

A técnica Juliana Silva Miranda pelos ensinamentos apoio e pela amizade ao longo da jornada.

Aos meus colegas de laboratório Camila, Fernanda, Gabi, Gabrielly, Iasmin, Karen, Marco, pelo apoio, colaboração na realização do trabalho, pela amizade e por serem instrumentos para minha evolução pessoal.

Ao Laboratório de Imunoparasitologia da Universidade Federal de Uberlândia, por ceder espaço e pelo suporte na leitura dos experimentos.

Ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas e as secretárias Lucileide e Lucélia.

Colaboradores do projeto

Este trabalho conta com a colaboração da Profª. Dra. Alaíde Braga de Oliveira, da Universidade Federal de Minas Gerais.

RESUMO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença negligenciada, causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, intimamente ligada a pobreza. É, também, a segunda doença parasitária que mata mais no mundo. O tratamento é a principal forma de controle da LV, entretanto, possui várias limitações: é prolongado, apresenta toxicidade e alto custo, dentre outras. A seleção de parasitos resistentes as medicações disponíveis também é outra limitação importante, especialmente em alguns países, como o Brasil. Assim, há a necessidade de implementação de novas estratégias terapêuticas para o tratamento da LV, como o reposicionamento e a associação de drogas, que provaram ser ferramentas muito importantes no manejo de diversas doenças, como HIV, malária e câncer. Os produtos naturais sempre estiveram presentes na busca por novas alternativas de tratamento e novos medicamentos. O presente trabalho objetivou avaliar a ação dos produtos naturais bisabolol, eugenol e lapachol, com atividade antileishmania descrita na literatura, em combinação com a anfotericina b, droga referência, em modelos *in vitro* e *in vivo* de LV. A concentração inibitória (CI₅₀) e a concentração citotóxica (CC₅₀) de cada uma das drogas foram calculadas e os índices terapêuticos (IT) foram determinados. Em seguida, realizou-se o estudo da interação das combinações entre os produtos naturais e a anfotericina b em promastigotas de *Leishmania infantum*. Os resultados foram analisados pelo método do isobograma de proporção fixa, e as concentrações inibitórias fracionadas (CIF) foram analisadas; A soma de CIF (Σ CIF) e a média Σ CIF ($\bar{\Sigma}$ CIF) foram calculadas para cada combinação. A natureza das interações foi classificada de acordo com a média de $\bar{\Sigma}$ CIF. A combinação de eugenol e bisabolol com anfotericina b mostrou valores $\bar{\Sigma}$ CIF que indicaram interação aditiva ou indiferente. Devido aos resultados promissores nos ensaios *in vitro*, o eugenol foi selecionado para avaliação da associação com anfotericina b, *in vivo*. Neste ensaio, camundongos BALB/c com LV foram distribuídos aleatoriamente em cinco grupos (n=6) e foram tratados (i) por via intraperitoneal (ip) com anfotericina b na dose de 5mg/Kg/48h/10 dias (dose padrão); (ii) anfotericina b na dose de 1mg/kg/24h/10 dias (subdose) por via ip; (iii) eugenol 75mg/kg/24h/10 dias via oral; com a associação anfotericina b 1mg/Kg/24h/10 dias/ip e eugenol 75mg/kg/24h/10 dias via oral (iv), e um grupo controle sem tratamento (v). Após o tratamento, os animais foram eutanasiados e a carga parasitária do fígado e baço determinada através de qPCR. Houve redução significativa da carga parasitária no baço ($p < 0,05$) e fígado ($p < 0,01$) dos animais tratados com a combinação de eugenol e sub dose de anfotericina b em relação ao grupo controle não tratado. De forma surpreendente, o impacto na redução da carga parasitária nos órgãos dos camundongos proporcionado pela combinação de eugenol + anfotericina b foi semelhante aquele induzido pelo tratamento padrão com anfotericina b, que utiliza uma dose 5 vezes maior da droga que a usada na combinação. Os resultados sugerem que a combinação eugenol + anfotericina b apresentou efeito aditivo ou sinérgico, em modelo murino de LV. Em conclusão, de maneira inédita este trabalho propõe a associação entre o produto natural eugenol e a droga referência anfotericina b em sub dose como alternativa terapêutica para a LV. Entretanto, novos estudos são necessários a fim de avaliar outras combinações entre produtos naturais e drogas convencionais, além estabelecer a dose terapêutica ideal e a toxicidade da combinação eugenol +anfotericina b, visando propor um novo esquema terapêutico para a LV.

Palavras-chave: Leishmaniose visceral, Sinergismo, produtos naturais, eugenol, bisabolol, lapachol, anfotericina b, associação fármacos

ABSTRACT

Visceral leishmaniasis (VL) is a neglected disease, caused by protozoa of the genus *Leishmania*, closely linked to poverty. It is also the second parasitic disease that kills the most in the world. Treatment is the main form of VL control, however, it has several limitations: it is prolonged, presents toxicity and high cost, among others. The selection of parasites resistant to available medications is also another important limitation, especially in some countries, such as Brazil. Thus, there is a need to implement new therapeutic strategies for the treatment of VL, such as repositioning and drug association, which have proven to be very important tools in the management of several diseases, such as HIV, malaria and cancer. Natural products have always been present in the search for new treatment alternatives and new drugs. The present study aimed to evaluate the action of natural products bisabolol, eugenol and lapachol, with antileishmania activity described in the literature, in combination with amphotericin b, reference drug, in vitro and in vivo models of VL. The inhibitory concentration (IC_{50}) and cytotoxic concentration (CC_{50}) of each drug were calculated and the therapeutic indices (IT) were determined. Next, the interaction of the combinations between natural products and amphotericin b in *Leishmania infantum* promastigotes was performed. The results were analyzed by the fixed proportion isobogram method, and fractional inhibitory concentrations (CIF) were analyzed; The sum of CIF (ΣCIF) and the mean ΣCIF ($X\Sigma CIF$) were calculated for each combination. The nature of the interactions was classified according to the mean of $X\Sigma CIF$. The combination of eugenol and bisabolol with amphotericin b showed $X\Sigma CIF$ values that indicated additive or indifferent interaction. Due to promising results in the in vitro assays, eugenol was selected for evaluation of association with amphotericin b in vivo. In this trial, BALB/c mice with VL were randomly assigned to five groups ($n = 6$) and treated (i) intraperitoneally (ip) with amphotericin b 5 mg/kg/48h/10 days (standard dose); (ii) amphotericin b at the dose of 1mg/kg/24h/10 days (subdose) ip; (iii) eugenol 75mg/kg/24h/10 days orally; with the combination of amphotericin b 1mg/kg/24h/10 days / ip and eugenol 75mg/kg/24h/10 days orally (iv), and a control group without treatment (v). After treatment, the animals were euthanized and the parasite burden of the liver and spleen determined by qPCR. There was a significant reduction in parasite load in the spleen ($p < 0.05$) and liver ($p < 0.01$) of the animals treated with the combination of eugenol and amphotericin b sub-dose compared to the untreated control group. Surprisingly, the impact on reducing the parasite burden on the organs of mice provided by the combination of eugenol + amphotericin b was similar to that induced by standard treatment with amphotericin b, which used a 5-fold higher dose of the drug than used in the combination. The results suggest that the combination eugenol + amphotericin b had an additive or synergic effect in a murine VL model. In conclusion, this paper proposes the association between the natural product eugenol and the reference drug amphotericin b in sub-dose as a therapeutic alternative for VL. However, further studies are needed to evaluate other combinations of natural products and conventional drugs, as well as to establish the optimal therapeutic dose and toxicity of the combination eugenol + amphotericin b, in order to propose a new therapeutic regimen for VL.

Keywords: Leishmaniasis, synergism, natural products, eugenol, bisabolol, lapachol, amphotericin b, drug association

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Valores de CC ₅₀ determinados para células HepG2, valores de CI ₅₀ determinados para formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> e índice terapêutico (IT) após incubação por 48 horas	25
Tabela 2	Valores de CI ₅₀ , CIF, Σ CIF e $X\Sigma$ CIF da associação entre eugenol com anfotericina b promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	26
Tabela 3	Valores de CI ₅₀ , CIF, Σ CIF e $X\Sigma$ CIF da associação entre bisabolol com anfotericina b promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	26

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Representação esquemática do ciclo de vida de <i>Leishmania</i> spp	4
Figura 2	Prevalência da leishmaniose visceral no mundo	5
Figura 3	Estrutura do bisabolol	9
Figura 4	Estrutura do eugenol	10
Figura 5	Estrutura do lapachol	11
Figura 6	Representação gráfica de um isobolograma, mostrando as possíveis interações: aditividade, antagonismo e sinergismo. Fonte: Tallarida, 2006 (modificado).	13
Figura 7	Desenho esquemático de placa para ensaio de avaliação da associação entre os produtos naturais e anfotericina b contra promastigotas de <i>L. infantum</i>	22
Figura 8	Curvas de concentração dose-efeito referentes à inibição de promastigotas de <i>L. infantum</i> para diferentes combinações de anfotericina b e eugenol	27
Figura 9	Isobolograma representando interação <i>in vitro</i> da associação de anfotericina b e eugenol contra <i>L. infantum</i>	28
Figura 10	Carga parasitária no baço e fígado de camundongos Balb/C infectados com 1×10^7 promastigotas de <i>Leishmania (L.) infantum</i>	30

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS: *Acquired immunodeficiency syndrome*

BOD: *Biological Oxygen Demand*

CC₅₀: Concentração citotóxica em 50%

CCD: Cromatografia em camada delgada

CDC: *Centers for Disease Control and Prevention*

CI₅₀: Concentração inibitória em 50%

CIF: Concentração Inibitória Fracionária

DMSO: Dimetilsulfóxido

DO: Densidade ótica

EE: Extrato Etanólico

HIV: *Human immunodeficiency virus*

ICBIM: Instituto de Ciências Biomédicas

IT: Índice terapêutico

LC: Leishmaniose cutânea

LV: Leishmaniose visceral

MTT: Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)- 2,5-difeniltetrazólio

PBS: *Phosphate buffer saline*

p.o.: *per os*

PSG - *Promastigote Secretory Gel*

RPMI: *Roswell Park Memorial Institute medium*

SFB: Soro fetal bovino

SMF: Sistema mononuclear fagocitário

OMS: Organização Mundial de Saúde

WHO: *World Health Organization*

α-MEM: *Minimum Essential Medium Alpha modification*

XΣCIF: Média da Somatória da Concentração Inibitória Fracionária

ΣCIF: Somatória da Concentração Inibitória Fracionária

Sumário

1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. Leishmanioses.....	1
1.2. Transmissão e ciclo biológico.....	2
1.3. Leishmaniose visceral.....	4
1.4. Quimioterapia anti leishmaniose.....	6
1.5. Produtos naturais e a busca de novos esquemas terapêuticos.....	9
2. JUSTIFICATIVA	15
3. OBJETIVOS.....	17
3.1. Objetivo geral	17
3.2. Objetivos específicos	17
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	18
4.1. Parasitos e células	18
4.2. Animais	18
4.3. Produtos Naturais.....	18
4.4. Ensaios <i>in vitro</i>	18
4.4.1. Atividade leishmanicida contra promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> ..	18
4.4.2. Ensaio de citotoxicidade sobre a linhagem celular HepG2	19
4.4.3. Ensaios de interação farmacológica dos produtos naturais com anfotericina b em promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	20
4.5. Ensaio <i>in vivo</i>	22
4.5.1. Determinação da atividade anti- <i>Leishmania in vivo</i>	22
4.5.2. Determinação de carga parasitária por PCR quantitativa (qPCR).....	23
4.6. Análise estatística	24
5. RESULTADOS	25

5.1. Atividade leishmanicida dos produtos naturais em promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> e citotoxicidade em linhagem de hepatoma humano (HepG2)	25
5.2. Interação farmacológica dos produtos naturais com anfotericina b em promastigotas de <i>Leishmania infantum</i>	25
5.3 Eficácia terapêutica <i>in vivo</i>	27
6. DISCUSSÃO	31
7. CONCLUSÕES	35
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36
ANEXOS	45
Anexo 1	45

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmanioses

As leishmanioses são um complexo de doenças causadas por protozoários que pertencem à ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae gênero *Leishmania*. Esses são parasitos intracelulares obrigatórios, que infectam células do sistema mononuclear fagocitário (SMF). São heteroxenos, sendo encontrados em duas formas evolutivas principais durante seu ciclo de vida, a promastigota (que é alongada, flagelada e móvel) e a amastigota (que possuem flagelo internalizado, ovalada e imóvel). A primeira pode ser encontrada no hospedeiro invertebrado e a segunda nos hospedeiros vertebrados (PACE, 2014; WHO, 2018).

Há várias espécies de parasitos, reservatórios e vetores envolvidos na cadeia de transmissão, sendo mais de 20 espécies de *Leishmania* causadoras da doença. As leishmanioses humanas podem apresentar diferentes manifestações clínicas, estas são resultado da interação entre a resposta imune do hospedeiro e a espécie do parasito, que se traduzem em duas apresentações clínicas principais, a leishmaniose cutânea (LC) e a leishmaniose visceral (LV), a última considerada a forma mais grave, que se não diagnosticada e tratada em tempo leva ao óbito do paciente (GRAMICCIA; GRADONI, 2005; WHO, 2018). Para a forma visceral estão associados os parasitos *Leishmania donovani* (Velho Mundo) e *Leishmania infantum* (Novo Mundo e Velho Mundo), para a forma cutânea, no Brasil, *L. (Viannia) braziliensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) guyanensis* são as mais prevalentes, e *L. major* é a responsável pela maioria dos casos de LC no Velho Mundo (BRASIL, 2014; PACE, 2014).

É uma das dez endemias prioritárias segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), e considerada como uma doença tropical negligenciada. Presente em 98 países e quatro continentes, colocando em risco de infecção cerca de 310 milhões de pessoas. Ficando atrás apenas da malária, é o segundo grupo de doenças parasitárias que mais mata no mundo. Possui incidência anual de aproximadamente 1,3 milhões de novos casos, destes, cerca de um milhão são de LC e cerca de 300.000 de pessoas acometidas pela LV, destas de 20.000 a 30.000 evoluem para o óbito (VON STEBUT, 2015; WHO,

2018). Dos casos notificados de LV, 90% ocorrem na Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil. A LC ocorre principalmente no litoral mediterrâneo, nas Américas e na Ásia ocidental, e cerca de 75% desses casos ocorrem no Brasil, Síria e Afeganistão (PACE, 2014; WHO, 2018).

A transmissão do parasito ocorre através da picada de fêmeas de insetos dípteros da família Psychodidae, gênero *Lutzomyia* no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo (PACE, 2014). Durante o repasto sanguíneo, a fêmea do inseto infectado regurgita promastigotas metacíclicas (forma infectante) na solução de continuidade provocada pela picada no hospedeiro vertebrado (animais silvestres ou o ser humano) (CDC, 2018; PACE, 2014; VON STEBUT, 2015). A infecção é considerada uma zoonose, quando transmitida de um reservatório animal para o vetor e, posteriormente, para o hospedeiro humano e outros animais; ou antroponótica, quando o parasito é transmitido entre humanos. A maior parte dos casos são zoonóticos, sendo o homem um hospedeiro eventual (DESJEUX, 2004; SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015). Porém, quando ocorre a forma zoonótica, os reservatórios primários de *Leishmania* são mamíferos silvestres como roedores e canídeos, e para a LV a espécie mais relevante na epidemiologia são cães domésticos (RODRIGUES et al., 2015).

Para a prevenção e controle das leishmanioses, várias estratégias de intervenção são sugeridas por órgãos nacionais e internacionais como o controle de vetores, controle de reservatórios, o diagnóstico precoce e o tratamento dos casos humanos, sendo o tratamento a principal forma de controle (BRASIL, 2014; WHO, 2018). Por se tratar de uma doença negligenciada, existe carência de investimentos em novas drogas e vacinas, o que dificulta seu controle (CORRAL-CARIDAD et al., 2012; WHO, 2017).

1.2. Transmissão e ciclo biológico

Os parasitos sendo heteroxenos, realizam parte do ciclo em hospedeiros vertebrados, mamíferos pertencentes às ordens Carnivora (cães e gatos), Xenarthra (tatus e preguiças), Marsupialia (gambás), Primata (humanos e não humanos), Rodentia (ratos) (LAINSON; SHAW, 1987), e parte no inseto vetor invertebrado da ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae, denominados flebotomíneos. Estes são insetos

pequenos e possuem o hábito de vida crepuscular e pós-crepuscular, abrigando-se durante o dia em lugares protegidos e úmidos. Os flebotomíneo são encontrados em diferentes regiões geográficas e condições climáticas e ambientais e existem mais de 300 espécies, sendo 30 identificados como capazes de transmitir *Leishmania* (BATES, 2007).

Somente as fêmeas de flebotomíneos são transmissoras do parasito. Elas se infectam ao ingerir formas amastigotas presentes em células do SMF de um hospedeiro mamífero infectado, durante o repasto sanguíneo (KAYE; SCOTT, 2011; WHO, 2018). No intestino médio do vetor, as amastigotas se transformam em promastigotas procíclicas e se replicam intensamente. Após estágios de diferenciação (metaciclogênese), se transformam em promastigotas metacíclicas e migram para a probóscide do flebotomíneo (CDC, 2018; KAYE; SCOTT, 2011). Assim, ao fazer um novo repasto sanguíneo, o flebotomíneo regurgita as formas infectantes (promastigotas metacíclicas), associadas à sua saliva, na derme do hospedeiro. Acredita-se que a regurgitação das formas infectantes é garantida por meio da produção de uma glicoproteína secretada pelas promastigotas metacíclicas, no tubo digestivo do inseto vetor, a PSG (*promastigote secretory gel*). Esta proteína obstrui a passagem do alimento durante o repasto sanguíneo levando o flebotomíneo a regurgitar a saliva, composta por substâncias imunomoduladoras, anestésicas, vasoativas, dentre outras, juntamente as formas infectantes, no local da picada (BATES, 2007). As formas promastigotas metacíclicas são fagocitadas por macrófagos residentes e células dendríticas dérmicas. Após serem internalizadas, se transformam em amastigotas, iniciando uma reprodução por divisão binária dentro do vacúolo parasitóforo. Quando as células hospedeiras estão repletas com amastigotas, elas se rompem e liberam os parasitos permitindo a reinfecção de novos fagócitos locais. O ciclo se completa quando os fagócitos infectados são ingeridos pela fêmea do flebotomíneo durante o repasto sanguíneo (CDC, 2018; KAYE; SCOTT, 2011) (**Figura 1**).

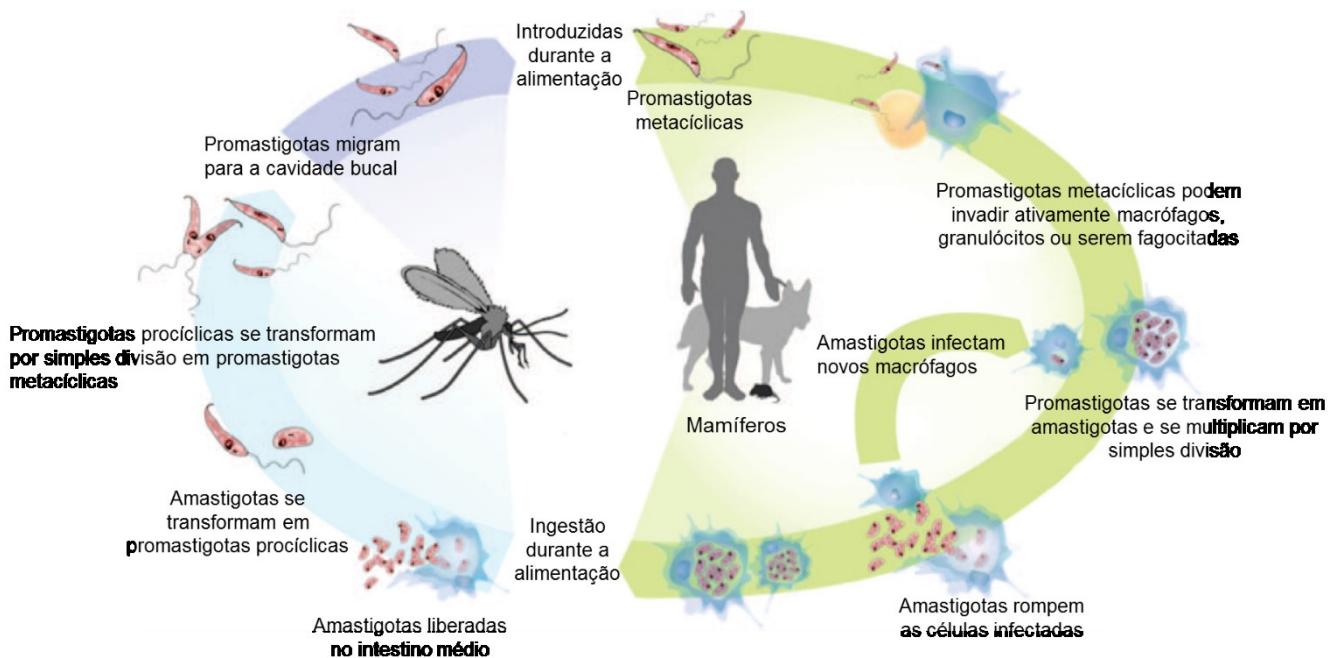


Figura 1 - Representação esquemática do ciclo de vida de *Leishmania* spp (Adaptado de HARRHAY et al., 2011). As fêmeas de flebotomíneos ingerem células fagocíticas mononucleares, infectadas pelas formas amastigotas de *Leishmania*, durante o repasto sanguíneo. No intestino médio do vetor, formas amastigotas se transformam em promastigotas, por simples divisão, se desenvolvem e migram para a probóscide. Durante o repasto sanguíneo as promastigotas são regurgitadas na solução de continuidade provocada pela picada nos hospedeiros humanos ou outros mamíferos. As promastigotas são fagocitadas por macrófagos e outros tipos de células fagocíticas, e se transformam dentro dessas células em amastigotas, que se multiplicam por divisão binária simples, rompem as células infectadas e passam a infectar outras células fagocíticas mononucleares.

1.3. Leishmaniose visceral

A LV é uma doença de acometimento sistêmico, também conhecida como calazar. Geralmente é assintomática ou oligossintomática e, quando há sinais, os mais comuns são: febre, esplenomegalia acompanhado ou não de hepatomegalia, perda de peso, distensão abdominal e fraqueza, que progridem ao longo de semanas a meses. Quando não tratada leva ao óbito cerca de 95% dos casos (BRASIL, 2014; PACE, 2014). Endêmica em 35 países, afetando principalmente aqueles menos desenvolvidos, mais de 90% dos novos casos notificados ocorrem em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Estima-se 300.000 novos casos de LV a cada ano, sendo o Brasil responsável por 96% dos casos nas Américas (Figura 2). O número registrado de óbitos nessas regiões tem aumentado desde 2012, registrando-se uma taxa de mortalidade de 7,9% em 2016, a mais alta comparada aos outros continentes (OPAS, 2014; WHO, 2018). No Brasil foram notificados 3200 novos casos em 2016 com 265 óbitos, e 4511 em 2017, com 323 óbitos em 2017 (BRASIL, 2018). O número de casos

de LV em crianças menores de 10 anos também atingiu sua maior taxa (15,5% dos casos) em 2016, sendo que alguns países chegaram a registrar mais de 40% dos casos nessa faixa etária (OPAS, 2014).

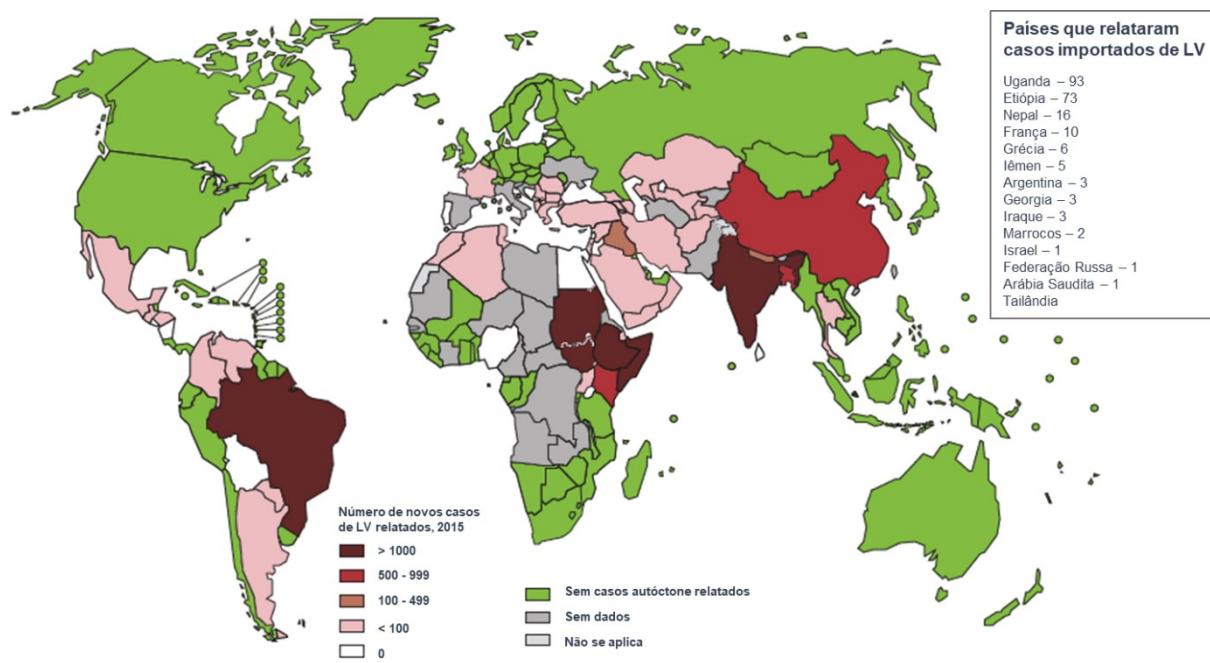


Figura 2 - Prevalência da leishmaniose visceral no mundo, 2015. Fonte: WHO (2018).

Os principais fatores de risco associados a doença são condição socioeconômica, suscetibilidade do hospedeiro humano a infecções como imunossupressão e desnutrição, mobilidade da população, mudanças ambientais, desmatamento (DESJEUX, 2001; WHO, 2018).

A LV tem sido considerada emergente quando em coinfecção com HIV, sendo que esses pacientes têm chances maiores de desenvolver sintomas mais exacerbados da doença, com altas as taxas de recidiva e mortalidade. Altas taxas de coinfecção *Leishmania*-HIV são relatadas no Brasil, na Etiópia e no estado de Bihar, na Índia, o que corresponde de 2 a 9% de todos os casos de LV. A coinfecção começou a ser relatada na década de 1990 ao longo da bacia do Mediterrâneo. As infecções se promovem mutuamente, sendo que o risco de adoecer por LV é 200 vezes maior em portadoras do HIV. Por sua vez, em pacientes com LV a replicação do HIV é favorecida, podendo desencadear/reagudizar a AIDS (WHO, 2018; ZIJLSTRA, 2014).

Sua importância em saúde pública no Brasil ainda se deve ao número de casos e a expansão geográfica, destacando-se as regiões Nordeste, Sudeste e Centro Oeste com 1523, 592 e 158 casos, respectivamente, no ano de 2016. Na Região Norte do Brasil também foram observados 578 casos, em 2016, endossando essa dispersão. A letalidade em 2016 no Brasil alcançou 7,4%, com total de 265 óbitos. Continua também em expansão, ocorrendo na Argentina, Paraguai e no Uruguai, reforçando a necessidade de atenção e vigilância epidemiológica (BRASIL, 2014; OPAS, 2014).

Sem uma vacina efetiva, as medidas de controle se baseiam no controle vetorial e dos reservatórios, monitoramento da doença, mobilização e educação da população, diagnóstico precoce e acurado, e o tratamento dos casos humanos, sendo este último a principal estratégia de controle da LV (CORRAL et al., 2012; WHO, 2018)

1.4. Quimioterapia anti leishmaniose

Os medicamentos de primeira escolha para o tratamento da LV são os antimoniais pentavalentes (Sb^{5+}), como o estibogluconato de sódio (Pentostan®), que não é comercializado no Brasil, e o antimoniato de N-metil d-glucamina (Glucantime®). O primeiro relato de uso medicinal dos antimoniais foi em 1912, pelo médico brasileiro Gaspar Viana, que observou a eficácia do tárтарo emético, um antimonial trivalente (Sb^{3+}), no tratamento da leishmaniose cutâneo-mucosa (HALDAR; SEN; ROY, 2011). Administrado preferencialmente por via intravenosa, com administração lenta, pode também ser administrado intramuscular em músculo compatível. É preconizada dose de 20 mg/kg/dia, uma vez ao dia, não excedendo 4.500mg/dia, durante 30 dias. Seus principais efeitos adversos são artralgias, mialgias, inapetência, náuseas, vômitos, plenitude gástrica, epigastralgia, pirose, dor abdominal, dor no local da aplicação, febre, cardiotoxicidade, hepatotoxicidade, nefrotoxicidade e pancreatite. Assim, há necessidade de monitorar enzimas hepáticas, função renal, amilase e lipase sérica, bem como realizar eletrocardiograma durante todo o tratamento monitorando possíveis arritmias e outras anormalidades cardíacas (BRASIL, 2011; SUNDAR; AGARWAL, 2017).

O antimoniato de meglumina é contraindicado em algumas situações como pacientes acima de 50 anos, portadores de cardiopatias, nefropatias, hepatopatias e doença de

Chagas devido aos efeitos adversos e gestação, pois atravessa a barreira transplacentária, podendo impregnar no tecido nervoso do feto, levando a síndromes de retardamento mental (BRASIL, 2014). Quando não se obtém resposta ao tratamento com o antimonial pentavalente ou na impossibilidade de seu uso, a segunda opção utilizada, na maioria dos casos, é a anfotericina b (BRASIL, 2014; PACE, 2014).

A anfotericina b é um antibiótico poliênico macrolídeo de amplo espectro, obtido de culturas do actinomiceto *Streptomyces nodosus*. No final dos anos 50 a anfotericina b já era usada em alguns casos clínicos e em 1965 foi aprovada pelo *U.S. Food and Drug Administration* (FDA), sendo o primeiro antifúngico aprovado pelo referido órgão. A atualmente considerado o fármaco mais potente contra todas as formas clínicas de leishmaniose. O Ministério da Saúde do Brasil disponibiliza duas apresentações de anfotericina b: o desoxicolato de anfotericina b e a anfotericina b lipossomal (AmBisome®), a eficácia dessas apresentações é comparável, porém, a forma lipossomal apresenta toxicidade significativamente menor, permitindo que o fármaco seja utilizado em doses maiores e atinja níveis plasmáticos mais elevados que o desoxicolato de anfotericina b. Atualmente a terapia preconizada para o desoxicolato de anfotericina é a dose de 1 mg/kg/dia por infusão venosa, durante 14 a 20 dias, dose máxima de 50mg/ dia e, para o AmBisome®, 3 mg/kg/dia, durante sete dias, ou 4 mg/kg/dia, durante cinco dias (BRASIL, 2006, 2014).

O mecanismo de ação da anfotericina b em *Leishmania* está relacionado a sua ligação ao ergosterol/episterol, principais esteróis presentes na membrana celular do parasito. Esta ligação produz micelas, que formam canais transmembrana, alterando a permeabilidade da membrana e, consequentemente, o equilíbrio osmótico intracelular, com perda de íons e outros componentes celulares. Além disso, ocorre a inibição da bomba de prótons e a indução da peroxidação lipídica da membrana. Em mamíferos, a anfotericina b se liga ao colesterol, o mais abundante lipídeo presente na membrana. Esta ligação, mesmo que de baixa afinidade, parece ser responsável por parte dos efeitos colaterais associados a terapia com anfotericina b (TIPHINE; LETSCHER-BRU; HERBRECHT, 1999). Os efeitos colaterais mais frequentes observados na terapia com anfotericina b são febre,

cefaleia, náusea, vômitos, tremores, calafrios, hiporexia, flebite, cianose, hipotensão, hipopotassemia, hipomagnesemia e alteração da função renal (BRASIL, 2014).

As formulações lipossomais de anfotericina b interagem e se ancoram fortemente na bicamada lipídica das membranas celulares. Essa associação faz com que a anfotericina b não seja liberada diretamente quando entra na circulação sanguínea, o que modifica a biodistribuição da droga, diminuindo a captação por células renais e, assim, reduzindo a toxicidade e promovendo a absorção preferencial pelas células reticuloendoteliais que abrigam os parasitas (BRASIL, 2011, 2014; CHOUHAN et al., 2014; SUNDAR; AGARWAL, 2017; TIPHINE; LETSCHER-BRU; HERBRECHT, 1999).

O custo elevado do tratamento com anfotericina b é outro fator a destacar, tanto pelo alto custo da droga em sua forma lipossomal, quanto pela frequente necessidade de cuidados médicos relacionados aos efeitos colaterais, mais pronunciados naqueles indivíduos tratados com desoxicolato de anfotericina b (BRASIL, 2014; TIPHINE; LETSCHER-BRU; HERBRECHT, 1999).

Outro fármaco usado no tratamento das leishmanioses é a paramomicina - antibiótico aminoglicosídeo, geralmente administrado em dose de 15 mg/kg por 21 dias. O efeito colateral mais comum é a dor no local da administração, que é intramuscular, seguido por ototoxicidade reversível, aumento das transaminases hepáticas e nefrotoxicidade (SUNDAR; CHAKRAVARTY, 2015; VAN GRIENSVEN et al., 2010).

A miltefosina (hexadecilfosfocolina), inicialmente desenvolvido como fármaco antineoplásico, foi o primeiro medicamento de administração via oral na terapia contra LV, vem sendo utilizada principalmente na Índia, apresenta efeitos colaterais como nefrotoxicidade, teratogenicidade, e problemas gastrointestinais devido à administração via oral. A meia vida prolongada (150 a 200h) da miltefosina leva a preocupação com a seleção de parasitos resistentes ao fármaco (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006; SUNDAR; AGARWAL, 2017).

Dentre as terapias disponíveis atualmente para o tratamento da LV, algumas em uso por mais de 70 anos, todas apresentam limitações, quer seja pela toxicidade, quer seja

aumento do número de cepas resistentes, ou pelo alto custo. Assim, se faz necessário melhorar as estratégias terapêuticas existentes, desenvolver novas terapias e/ou novos fármacos (CORRAL et al., 2012; WHO, 2018). Nesta perspectiva, os produtos naturais são a fonte mais promissora para o desenvolvimento de novas drogas ou terapias, e a literatura tem demonstrado resultados promissores, seja com extratos brutos, óleos essenciais ou outros derivados de plantas, que apresentaram ação efetiva contra *Leishmania* (HARVEY, 2008; HARVEY; EDRADA-EBEL; QUINN, 2015; ORYAN, 2015).

1.5. Produtos naturais e a busca de novos esquemas terapêuticos

A utilização de plantas com o objetivo de aliviar sintomas e tratamento de doenças é histórico. Com intervenções culturais, religiosas e saber empírico, a atividade popular de observação do efeito terapêutico das espécies medicinais foi se afirmando e se agregando durante séculos (SALES; SARTOR; GENTILLI, 2015). Para milhões de pessoas, medicamentos fitoterápicos e terapêutica tradicional são a única fonte de assistência para tratamento de doenças, culturalmente é aceitável e se torna atraente diante dos altos custos da assistência médica (WHO, 2013).

Sesquiterpenos foram identificados como constituintes ativos presentes em várias plantas medicinais utilizadas para fabricação de medicamentos, amplas propriedades biológicas como atividade anti-oxidante, anti-inflamatório e anticancerígena. O bisabolol ou α -(-)-bisabolol (**Figura 3**) também conhecido por levomenol é um álcool sesquiterpênico monocíclico, isolado pela primeira vez em 1951 por Isaac e colaboradores, das flores de camomila (*Matricaria chamomilla*). Estudos mostram atividade contra bactérias, fungos e *cândida albicans*, também exibiu atividade

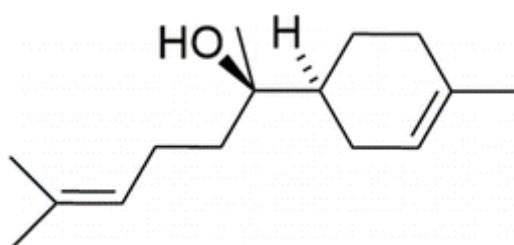


Figura 3 – Estrutura do bisabolol

antibacteriana *in vitro* contra *S. aureus*, *S. epidermidis*, *B. cereus* e *B. subtilis* (KAMATOU e VILJOEN, 2010; CORPAS-LÓPEZ et al., 2015).

Há vários estudos com o objetivo de avaliar o potencial terapêutico das plantas, sendo que algumas já possuem atividade terapêutica comprovada. Isolado pela primeira vez em 1929, o eugenol (**Figura 4**) é derivado da espécie *Eugenia caryophyllata*, cujo botão é conhecido como cravo, e contém cerca de 45 a 90% desse produto natural (KAMATOU; VERMAAK; VILJOEN, 2012). O eugenol está presente também nos óleos essenciais de outras plantas aromáticas como *Dic平elium cariophyllum*, *Pimenta dioica*, *Croton zehntneri* e *Croton zehntneri*, e também é o principal componente do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* (DUTRA et al., 2016; KAMATOU; VERMAAK; VILJOEN, 2012; UEDA-NAKAMURA et al., 2006). A molécula de eugenol ($C_{10}H_{12}O_2$) é solúvel em solventes orgânicos e levemente em água, é um líquido amarelado oleoso, fracamente ácido, membro da classe dos fenilpropanóides (KAMATOU; VERMAAK; VILJOEN, 2012; MARCHESE et al., 2017). Com relatos de uso como especiaria por mais de 2.000 anos na China, teve seu primeiro registro de uso medicinal em 1640 na França. Ensaios recentes apontam para várias propriedades farmacológicas, como ação antibacteriana, antifúngica, antimarial, antiinflamatória, antioxidante, analgésica entre outras, com resultados promissores para ação anti-*Leishmania* (KAMATOU; VERMAAK; VILJOEN, 2012; MILADI et al., 2017).

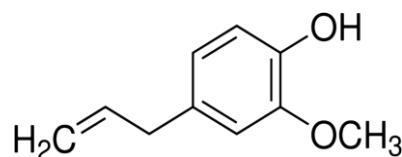


Figura 4– Estrutura do eugenol (4-allyl-2-metoxifenol)

As naftaquinonas de espécies de Bignoniaceae apresentam diversas atividades biológicas e são umas das categorias de produtos químicos mais estudados do ponto de vista farmacológico dos últimos tempos (OLIVEIRA et al, 1990; FERREIRA et al., 1996). As naftaquinonas possuem capacidade de reduzir o estresse oxidativo nas células, sendo este motivo de grande interesse nesta classe de substâncias, especialmente em relação a sua atividade contra parasitos intracelulares obrigatórios (DA SILVA et al., 2003).

Vários estudos ligados às naftaquinonas devem-se a busca pelo lapachol [2-hidroxi-3-(3-metil-2-butenil)-1,4-naftoquinona] (**Figura 5**) que é um produto natural isolado de várias espécies de plantas da família Bignoniaceae (LIMA, et al. 2004). Além de ser obtido a partir de fontes naturais, pode ser facilmente sintetizado (Da SILVA et al., 2010), e essas qualidades favorecem a síntese de outras substâncias com potenciais atividades farmacológicas, incluindo o desenvolvimento de novas drogas que atuem contra doenças negligenciadas (CASTRO et al., 2013).

O lapachol é conhecido desde 1858 e foi isolado pela primeira vez no final do século XIX por Paternó da espécie *Handroanthus impetiginosus* (*Tabebuia avellanedae* - ipê-roxo). O lapachol tem sido muito estudado por apresentar importantes atividades biológicas, como, tripanossomicida, antitumoral, leishmanicida e redução da proliferação de queratinócitos (MÜLLER, et al. 1999; BALASSIANO, et al., 2005; ZHANG, et al., 2016).

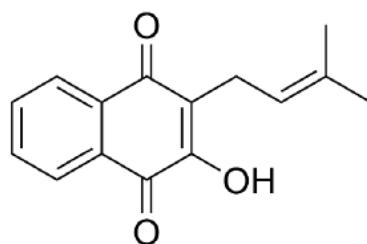


Figura 5 - Estrutura do lapachol

Com território que equivale à metade da América do Sul, o Brasil é um país com uma vasta biodiversidade. Possui a maior diversidade genética de vegetais do mundo, com cerca de 20% do total de espécies de plantas do planeta, e é o primeiro quando se trata de número de espécies vegetais. Esse enorme patrimônio de espécies vegetais, já escasso nos países desenvolvidos, tem atualmente um valor econômico-estratégico inestimável, sendo o campo de desenvolvimento de novos fármacos o de maior potencial. Entretanto, apenas 8% da flora brasileira foi estudada em busca de compostos para desenvolvimento de novos fármacos, com somente 590 registros no Ministério da Saúde do Brasil de plantas para comercialização (GUERRA; NODARI, 2011; SALES; SARTOR; GENTILLI,

2015). Estima-se que 26% do faturamento da indústria farmacêutica nacional seja proveniente de medicamentos derivados de plantas, com os fitoterápicos ocupando cerca de 25% das prescrições médicas em países desenvolvidos e cerca de 80% em países em desenvolvimento (GUERRA; NODARI, 2011). A diversidade de efeitos terapêuticos dos produtos naturais tem despertado interesse, sendo conduzido estudos para determinar suas propriedades farmacológicas, bem como suas interações sinérgicas e aditivas com outras drogas, visando o desenvolvimento de produtos fitoterápicos eficazes, seguros e de baixo custo. Sendo assim, os produtos naturais desempenham importante e continuado papel no desenvolvimento de novos fármacos (NEWMAN; CRAGG, 2016)

1.6. Repositionamento e associação de fármacos

O reposicionamento de fármacos consiste em encontrar novos usos para os fármacos ou compostos já existentes. Um exemplo de reposicionamento de fármacos bem-sucedido é o uso da anfotericina b par o tratamento das leishmanioses, uma vez que esta droga é um antibiótico que foi primariamente desenvolvida para o tratamento de infecções fúngicas (WHO, 2010).

A combinação de fármacos é uma abordagem bem estabelecida para tratamento de algumas doenças como HIV, tuberculose e câncer. A possibilidade de combinar produtos naturais ou similares com fármacos sintéticos introduzindo-os em regimes terapêuticos convencionais ainda não é explorada, porém é uma área de muitas oportunidades (AHMAD et al., 2015; OPREA; MESTRES, 2012). No caso das leishmanioses, esta é uma opção frente ao aumento dos relatos de casos de resistência aos fármacos de primeira escolha e aos efeitos adversos indesejados causados pela terapia usual (OLLIARO, 2010). A associação de drogas para o tratamento das leishmanioses proporcionaria vantagens como o aumento ou potencialização do efeito terapêutico (uso de fármacos e/ou produtos naturais com interação aditiva ou sinérgica), minimizaria ou desaceleraria a seleção de parasitos resistentes às drogas, reduziria a dose terapêutica (mantendo ou melhorando sua eficácia), reduziria os efeitos adversos indesejáveis, entre outros (CHOU, 2006; HALDAR; SEN; ROY, 2011).

A associação de fármacos tem registro desde o princípio da história, e há muito tem-se realizado tentativas de avaliar e medir quantitativamente a relação de dose e efeito dessas associações (CHOU, 2006). O método do isobolograma (**Figura 6**) foi introduzido com o objetivo de avaliar as interações entre os fármacos. É um método gráfico em coordenadas cartesianas, em que as doses de dois fármacos testados são colocadas um em cada eixo. É baseado na potência relativa, e não traz qualquer informação sobre o mecanismo de ação, e o seu objetivo é avaliar o tipo de interação que existe quando as duas drogas são combinadas (TALLARIDA, 2012).

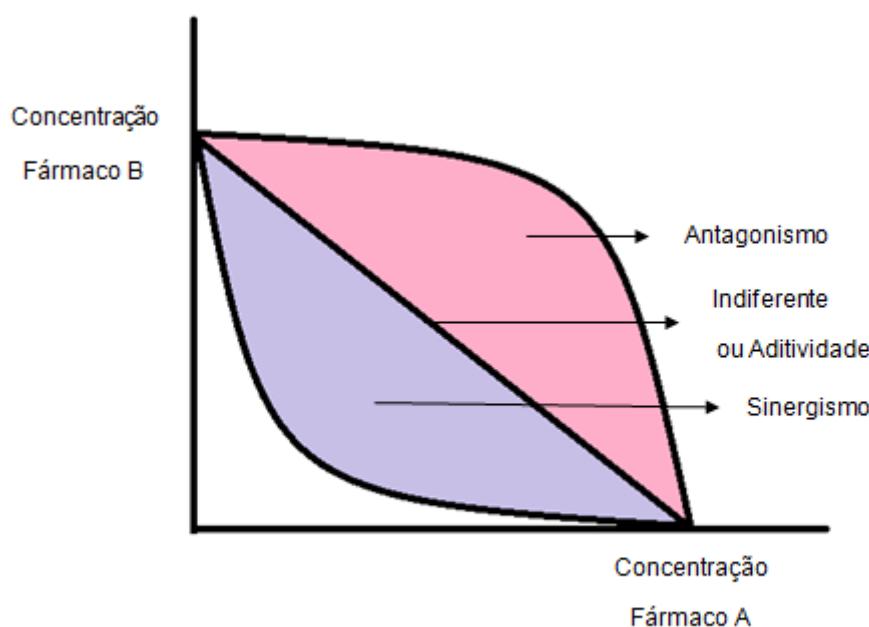


Figura 6 - Representação gráfica de um isobolograma, mostrando as possíveis interações: aditividade, antagonismo e sinergismo. Fonte: Tallarida, 2006 (modificado).

O pré-requisito para construção do isobolograma é conhecer a potência e a curva de dose bem como o efeito de cada droga isoladamente (CHOU, 2006). A partir de então é possível determinar as concentrações da droga capazes de produzir o efeito de interesse, que usualmente é metade do efeito e/ou inibição máxima (CI_{50} = concentração inibitória, a CI_{50} é a concentração dos compostos testados capaz de gerar redução de 50% no crescimento do agente infeccioso), gerando uma linha de aditividade ou isobol (TALLARIDA, 2012). Ao considerar duas concentrações, A e B, de duas drogas que produzem o mesmo efeito, tem-se uma linha isoaditiva; uma linha convexa para o eixo "x" seria o isobol infra-aditiva, indicando antagonismo parcial entre os fármacos; e a linha

côncava para o eixo “x” seria um isobol supra aditivo, correspondendo a um efeito potencializador/sinérgico de uma droga em relação a outra (MESQUITA; TEMPONE; REIMÃO, 2014).

O tipo de interação entre as drogas é frequentemente expresso em concentração inibitória fracionária (CIF). O CIF é a concentração inibitória (CI_{50}) de cada droga em combinação dividida pela concentração inibitória (CI_{50}) da droga sozinha. A somatória dos CIFs ($\sum CIF = CIF_A + CIF_B$) expressa a extensão da interação, também denominado índice de combinação. Dependendo da metodologia utilizada, observou-se problemas de reproduutibilidade e classificação do tipo de associação. Assim, a interpretação mais conservadora e mais recomendada pela literatura para o isobograma é: sinergismo ($CIF \leq 0,5$), antagonismo ($CIF > 4,0$) e aditivo ou indiferente ($CIF > 0,5 - 4,0$) (MESQUITA et al., 2014; ODDS, 2003; TALLARIDA, 2012).

Para o método isobograma de proporção fixa modificado por Fivelman, Adagu e Warhurst (2004) e Mesquita e colaboradores (2014), utiliza-se diluição em série de proporções fixas de ambas as drogas, assim as concentrações de cada droga são variadas ao mesmo tempo, ao longo de um determinado intervalo de concentração pré-determinada. Calcula-se a CI_{50} de cada droga no ensaio, em seguida, calcula-se a concentração máxima de cada droga, de forma que a terceira concentração seriada seja o valor do CI_{50} . Para ensaios *in vitro*, cada curva usualmente contém de 5 a 8 pontos, com as seguintes proporções para os fármacos: 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4, 0:5. A partir destas combinações, calcula-se o CIFs para cada proporção de combinação (4:1, 3:2, 2:3, 1:4), e esses valores são utilizados na construção do isobograma. São calculados os valores da somatória dos CIF ($\sum CIF = CIF_{droga\ A} + CIF_{droga\ B}$), a média geral dos $\sum CIF$ ($X\sum CIF$) e, a partir dessa média, determina-se a natureza da interação das drogas (FIVELMAN; ADAGU; WARHURST, 2004; MESQUITA et al., 2014).

2. JUSTIFICATIVA

Considerada problema de saúde pública mundial, com disseminação em áreas anteriormente livres, novas epidemias em locais endêmicos, a LV está frequentemente ligada a más condições habitacionais, pobreza, imunossupressão e urbanização (ORYAN; AKBARI, 2016; WHO, 2018). Com altas taxas de mortalidade, é a segunda parasitose que mais leva ao óbito no mundo. Estima-se 300.000 novos casos de LV com cerca de 20.000 a 30.000 mortes por ano (VON STEBUT, 2015). Outro desafio para o tratamento da LV é o aumento do número de casos de coinfecções com HIV, uma vez que a terapia atual tem demonstrado limitações, o que pode significar o desenvolvimento de possíveis reservatórios de cepas resistentes (VAN GRIENSVEN et al., 2010; VON STEBUT, 2015).

O arsenal de fármacos utilizados no tratamento da LV é limitado, e em alguns casos, o mesmo fármaco vem sendo utilizado por mais de 70 anos. Porém, esses fármacos apresentam limitações de uso, como elevada toxicidade e existência de parasitos resistentes (VAN GRIENSVEN et al., 2010; WHO, 2018).

O desoxicolato de anfotericina b é tóxico, e seu uso gera efeitos colaterais indesejáveis, levando a redução da dose terapêutica. Já a formulação lipossomal (AmBisome®), que é consideravelmente menos tóxica, é mais onerosa, inviabilizando o seu uso em muitos casos, uma vez que a LV é uma doença primariamente de pessoas pobres.

A associação de fármacos tem sido utilizada para tratamento de várias doenças, principalmente HIV, tuberculose e câncer, e como estratégia para o controle da dor (CHOU, 2006; CURATOLO e SVETICIC, 2002). A combinação de fármacos tem mostrado vantagens, como aumento da eficácia devido a interação sinérgica ou aditiva dos compostos, redução ou atraso de surgimento da resistência às terapias, menor custo e menos efeitos indesejáveis (CORRAL et al., 2012; VAN GRIENSVEN et al., 2010).

Os produtos naturais são usados para tratamento de várias doenças e como fonte de substâncias ativas para produção de novos fármacos, com relatos de uso desde o homem primitivo (SALES; SARTOR; GENTILLI, 2015). A associação da anfotericina b com

produtos naturais é uma alternativa para redução da dose terapêutica da anfotericina b, consequentemente redução da toxicidade, mantendo a eficácia.

Estudos relacionados a associação de anfotericina b com produtos naturais podem proporcionar avanço no estudo e no tratamento da LV, aumentando a eficácia, tolerância, reduzindo o custo do tratamento e limitando a resistência aos fármacos.

Neste trabalho avaliamos *in vitro* a atividade leishmanicida de produtos naturais (bisabolol, eugenol e lapachol) em associação com a anfotericina b, que é o fármaco mais potente do mercado e avaliamos *in vivo* a atividade leishmanicida do produto natural que apresentou melhor desempenho nos ensaios *in vitro*.

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

Avaliar o efeito das associações entre produtos naturais com atividade leishmanicida e anfotericina b em modelos *in vitro* e *in vivo* de leishmaniose visceral.

3.2. Objetivos específicos

- Avaliar a atividade leishmanicida dos produtos naturais bisabolol, eugenol e lapachol;
- Avaliar a atividade leishmanicida, dos produtos naturais, com melhor índice terapêutico, em combinações com anfotericina b em promastigotas de *L. infantum*;
- Estabelecer a citotoxicidade e o índice terapêutico dos produtos naturais e anfotericina b *in vitro*;
- Determinar a interação farmacológica, *in vitro*, entre os produtos naturais e a anfotericina b, em promastigotas de *L. infantum*;
- Avaliar a eficácia terapêutica da combinação mais eficaz *in vitro*, em modelo *in vivo* de LV.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Parasitos e células

Nos ensaios conduzidos nesse projeto foi utilizado o parasito *L. infantum* cepa MCAN/BR/2002/BH401, referência da OMS e células derivadas de hepatoblastoma primário, HepG2 A16 proveniente do criobanco de células e parasitos do Laboratório de Bioensaios em *Leishmania* - Departamento de Parasitologia/ICBIM-UFU, coordenado pelo o Prof. Dr. Sydnei Magno da Silva.

4.2. Animais

Todos os procedimentos de manipulação dos animais estão em acordo com os princípios éticos da experimentação animal e foram aprovados pelo Comitê de Ética na Experimentação Animal da UFU - CEUA/UFU (Protocolo CEUA/UFU nº 069/2013) (ANEXO 1).

Foram utilizados camundongos BALB/c machos de 6 a 8 semanas de idade, provenientes do Centro de Bioterismo e Experimentação Animal - CBEA/UFU. Os animais foram mantidos no CBEA/UFU, sobre condições adequadas de manejo técnico, com água e alimentação *ad libitum*, de acordo com as recomendações do Colégio Brasileiro de Medicina Veterinária, Colégio Brasileiro de Experimentação Animal - COBEA, e *Principles of Laboratory Animal Care* – NIH/EUA.

4.3. Produtos Naturais

Os produtos naturais usados foram o bisabolol, eugenol e lapachol, adquiridos da Sigma-Aldrich Co. LLC. (USA).

4.4. Ensaios *in vitro*

Os ensaios de eficácia e citotoxicidade *in vitro* foram realizados no Laboratório de Bioensaios em *Leishmania* do ICBIM/UFU.

4.4.1. Atividade leishmanicida contra promastigotas de *Leishmania infantum*

A concentração inibitória (CI₅₀) dos produtos naturais, bem como da anfotericina b foram obtidas por ensaio de viabilidade celular à base de resazurina (CORRAL et al., 2013).

Material e Métodos

Promastigotas de *L. infantum* ($2,5 \times 10^5$ parasitos/poço) em fase logarítmica de crescimento foram adicionadas em placas de cultura celular de 96 poços em meio α -MEM completo (*Minimum Essential Medium Eagle*, suplementado 20mM de HEPES, 10% de soro bovino fetal (SFB), 2mM de L-glutamina, 100U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina) e incubadas à 26°C em estufa BOD (B.O.D. LUCA-161/01 LUCADEMA, Brasil). Os produtos naturais e a anfotericina b (controle positivo de tratamento) foram diluídos em meio α -MEM completo em diferentes concentrações, variando de 450 μ M a 7 μ M para o bisabolol, de 610 μ M a 10 μ M para o eugenol de 412 μ M a 6 μ M para lapachol e de 0,54 μ M a 0,008 μ M para a anfotericina b. Parasitos não tratados foram utilizados para comparação de viabilidade (controle negativo). Os produtos naturais e a anfotericina b, em contato com os parasitos, foram incubados durante 48 h. Quatro horas antes do término da incubação, foi adicionada solução de resazurina (150 μ g/ml) (Sigma-Aldrich) a 10% v/v nos poços, e as placas foram mantidas por mais 4h a 26°C na BOD. Em seguida, a intensidade de fluorescência foi determinada em espectrofluorímetro (Spectramax M2, Molecular Devices LLC, EUA) utilizando os seguintes comprimentos de ondas: 550 nm de excitação e 590 nm de emissão. A intensidade de fluorescência, expressa em unidades arbitrárias, foi utilizada para o cálculo da viabilidade celular. Todos os compostos foram testados em triplicata para cada concentração e foram realizados três experimentos independentes.

A CI_{50} é a concentração dos compostos testes capaz de gerar redução de 50% no crescimento dos parasitos, refletindo em uma redução de 50% no valor da intensidade de fluorescência nos ensaios de resazurina, em relação ao controle (parasitos incubados com α -MEM completo, considerado 100% de viabilidade), calculada por análise de regressão.

4.4.2. Ensaio de citotoxicidade sobre a linhagem celular HepG2

A linhagem celular HepG2 A16, derivada de um hepatoblastoma primário humano, foi cultivada em garrafas plásticas de cultura celular de 75cm² em meio RPMI completo (RPMI 1640 (Sigma-Aldrich) suplementado com 10% de SFB, 20mM de HEPES, 100U/mL de penicilina e 100 μ g/mL de estreptomicina). As células foram mantidas a 37°C, 5% de CO₂ e 95% de umidade (CO₂ Incubator MCO-19IAUV-PA, Panasonic Corp., Japão). Subculturas (repiques) foram realizadas de três a cinco dias, após a contagem de células viáveis pela metodologia de exclusão por corante vital azul de tripan (0,4% p/v) (Sigma-Aldrich).

Material e Métodos

As células foram então incubadas (37°C, 5% de CO₂, 24 horas) em placa de 96 poços, em concentração ajustada para 2x10⁴ células/poço em meio RPMI completo, para aderência aos poços. Após o período de incubação, o meio dos poços foi esgotado e adicionado os compostos testes diluídos em RPMI completo nas concentrações de 4500 µM a 70 µM para o bisabolol, de 60.900 µM a 950 µM para o eugenol, de 165.104 µM a 2.580 µM para o lapachol e de 1,56 µM a 100 µM para anfotericina b. As culturas de células permaneceram expostas aos produtos naturais e anfotericina b durante 48 horas (37°C, 5% de CO₂). Após o período de incubação, os poços foram esgotados, e foi adicionada solução MTT (3-(4,5-dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol (MTT) (Sigma Aldrich) 50µg/poço. As placas foram incubadas por 1 hora e 30 minutos (37°C, 5% de CO₂). Passado esse período foi adicionado DMSO para solubilizar os cristais de formazan gerados, e as placas foram submetidas à leitura em espectrofotômetro (570nm) (Spectramax M2) (DUTTA et al., 2005; MOSMANN, 1983).

Cada experimento foi repetido três vezes, e a densidade ótica (DO) foi obtida pelo valor da média ± desvio padrão das leituras das amostras, realizadas em triplicata nas placas, subtraído do valor médio da DO dos poços contendo somente células incubadas com meio completo (considerado 100% de viabilidade).

A concentração citotóxica (CC₅₀) corresponde a concentração dos compostos testes capaz de gerar redução de 50% no crescimento das células, refletindo em uma redução de 50% no valor da DO nos ensaios de MTT em relação ao controle, calculada por análise de regressão linear a partir dos dados obtidos em cada experimento.

Foi determinado o índice terapêutico (IT) pela razão CC₅₀/CI₅₀. As amostras que apresentaram valor de IT maior que 10 foram consideradas eficazes e com ação seletiva para a *L. infantum* (BÉZIVIN et al., 2003).

4.4.3. Ensaios de interação farmacológica dos produtos naturais com anfotericina b em promastigotas de *Leishmania infantum*

As interações entre os produtos naturais com melhor índice terapêutico (IT), e anfotericina b *in vitro* foram avaliadas pelo método do isobolograma modificado (REIMÃO; TEMPONE, 2011; SEIFERT; CROFT, 2006). Resumidamente, os valores de concentração inibitória a 50% pré-determinados (CI₅₀) das drogas individuais obtidos contra promastigotas de *L. infantum* (item 4.4.1), foram utilizados para definir as

Material e Métodos

concentrações máximas dos produtos naturais e da anfotericina b, de forma que com o ponto de partida da diluição seriada de base dois a concentração inibitória a 50% (CI_{50}) ficaria próximo ao quarto poço da placa. Assim as concentrações máximas necessárias de cada fármaco seriam 134,91 μM para o bisabolol; 825,52 μM , para o lapachol, 182,7 μM para o eugenol e 0,32 μM para a anfotericina b.

A partir do CI_{50} das associações foram calculados a concentrações inibitórias fracionárias (CIFs) esta da seguinte maneira: CIF de anfotericina b = CI_{50} do fármaco ou produto natural em combinação/ CI_{50} fármaco ou produto natural sozinha. Em seguida foi realizado a soma dos CIFs ($\sum CIFs$ [CIF anfotericina b + CIF eugenol], por exemplo) (BERENBAUM, 1978). Os CIFs e $\sum CIFs$ foram calculados para todas as combinações, e os CIFs foram usados para construção de isobograma. A média dos $\sum CIFs$ foi utilizada para classificar a natureza da interação (MESQUITA et al., 2013; NUNES et al., 2017). Sinergismo foi definido como média $\sum CIF \leq 0,5$; indiferença ou aditividade como média $\sum CIF$ entre 0,5 e ≤ 4 ; e antagonismo como média $\sum CIF > 4$ (ODDS, 2003; SEIFERT; CROFT, 2006).

Promastigotas em fase logarítmica de crescimento ($2,5 \times 10^5$ parasitos/poço) foram adicionadas em placas de 96 poços em meio α -MEM completo e incubadas a 26°C em atmosfera de 5% de CO₂. Os produtos naturais com melhor índice terapêutico (IT) e anfotericina b foram diluídos em meio α -MEM completo em diferentes concentrações e combinações. As maiores concentrações das soluções seriam 134,91 μM para o bisabolol, 825,52 μM para o lapachol, 182,7 μM para o eugenol e 0,32 μM para anfotericina b, foram preparadas nas proporções de 5:0, 4:1, 3:2, 2:3, 1:4 e 0:5 (anfotericina b:produto natural) e distribuídas nas placas testes, seguindo-se a diluição seriada das mesmas. Parasitos não tratados foram utilizados para comparação de viabilidade (controle negativo) (**Figura 7**).

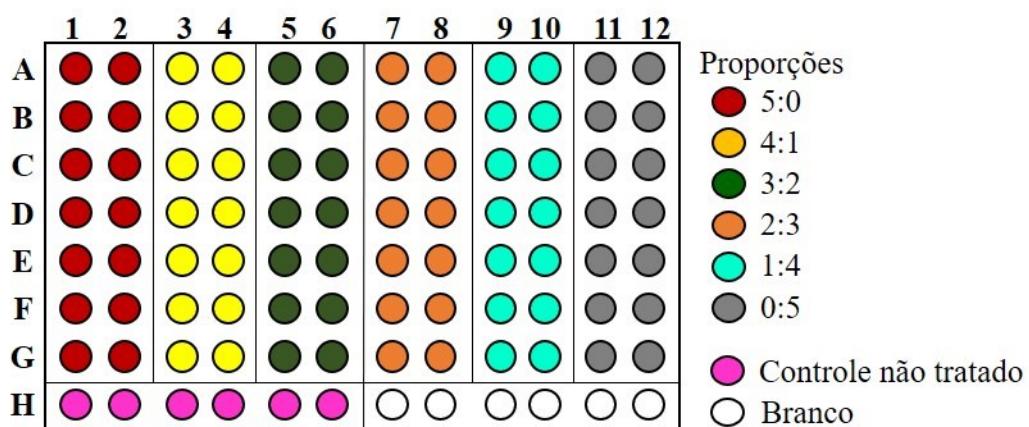


Figura 7 – Desenho esquemático de placa para ensaio de avaliação da associação entre os produtos naturais e anfotericina b contra promastigotas de *L. infantum*. As cores representam as proporções testadas seguidas de diluição seriada, na razão dois.

As combinações de produtos naturais e anfotericina b foram incubadas com os parasitos durante 48 h. Quatro horas antes do término da incubação, foi adicionada solução de resazurina a 10% v/v nos poços e as placas mantidas por mais 4h a 26°C. Em seguida, a intensidade de fluorescência foi determinada como descrito para os ensaios de atividade leishmanicida em promastigotas (item 4.4.1). Os compostos associados foram testados em duplicata para cada concentração e foram realizados três experimentos independentes.

4.5. Ensaio *in vivo*

4.5.1. Determinação da atividade anti-*Leishmania in vivo*

Para o ensaio *in vivo* de eficácia terapêutica foi selecionado o produto natural com melhor desempenho nos testes de interação farmacológica. Foram utilizados camundongos Balb/c machos, 8 semanas de idade e peso variando entre 20 – 25g. Os animais foram infectados com 1×10^7 promastigotas de *L. infantum* cepa MCAN/BR/2002/BH401 (dia 0) em fase estacionária de crescimento (cultura rica em formas metacíclicas).

Trinta dias após a infecção (dia 30), os animais foram distribuídos aleatoriamente em grupos, de acordo com a proposta terapêutica, conforme descrito a seguir:

Grupo 1: Seis animais que receberam, por via oral (*p.o.*), 200 μ l do produto natural selecionado o (75mg/kg), diluído em água e Tween 80 (10% v/v) durante 10 dias, com intervalo de 24 horas entre cada aplicação. Dose e via de administração baseada na literatura (ISLAMUDDIN et al., 2016);

Grupo 2: Seis animais que receberam, por via intraperitoneal (i.p.), 200 μ l de anfotericina b (1mg/kg) solubilizada em PBS durante 10 dias com intervalo de 24 horas entre cada aplicação; (MURRAY; HARIPRASHAD; FICHTL, 1996; SIFONTES-RODRÍGUEZ et al., 2015)

Grupo 3: Seis animais que receberam, via i.p., 200 μ l de anfotericina b (5mg/kg) solubilizada em PBS durante 10 dias com intervalo de 24 horas entre cada aplicação (MURRAY; HARIPRASHAD; FICHTL, 1996; SIFONTES-RODRÍGUEZ et al., 2015);

Grupo 4: Seis animais que receberam, associação contendo 100 μ l de anfotericina b (1mg/kg) via i.p., solubilizada em PBS e 100 μ l do produto natural de melhor desempenho *p.o.*, diluído em água e tween 80 durante 10 dias com intervalo de 24 horas entre cada aplicação (SIFONTES-RODRÍGUEZ et al., 2015; ISLAMUDDIN et al., 2016);

Grupo 5: Seis animais que receberam, por via oral, 200 μ l de solução salina estéril, a cada 24 horas, durante 10 dias.

Após o tratamento, os animais foram mantidos no CBEA/UFU, onde receberam água e alimentação balanceada *ad libitum*. Durante todo o experimento os parâmetros ingestão de alimento e água, comportamento, aspecto da pelagem e mucosas foram monitorados. Vinte e quatro horas após o término do tratamento os animais foram eutanasiados.

4.5.2. Determinação de carga parasitária por PCR quantitativa (qPCR)

Após a eutanásia, fígado e baço foram coletados, pesados e transferidos para tubos de microcentrífuga estéreis para a determinação da carga parasitária por qPCR, e congelados a -20°C até o uso. As extrações de DNA genômico foram realizadas em amostras de 20mg de cada órgão utilizando o kit RealiapPrep™ gDNA Tissue Miniprep System (Promega Co., EUA) de acordo com as instruções do fabricante.

As reações de qPCR foram realizadas em placas de 96 poços (Applied Biosystems by Life Technologies, EUA), em triplicata e processadas em termociclador (StepOne™ Real-Time PCR System, Applied Biosystems, EUA). Para determinar as cargas parasitárias foram utilizados iniciadores (direto L150 [5'-GGG (G/T)AG GGG CGT TCT(G/C)CG AA-3'] e reverso L152 [5'-(G/C)(G/C)(G/C) (A/T)CT AT(A/T) TTA CAC CAACCC C-3']) que amplificam um fragmento de 120pb da região conservada dos minicírculos do kDNA de *Leishmania* sp (DEGRAVE et al., 1994). As reações foram

realizadas em 25 μ L de volume final contendo 100nM de cada iniciador, 1x GoTaq qPCR Master Mix (Promega Co., EUA) e 50ng de DNA. O número de cópias de DNA de *L. infantum* em cada amostra foi determinado a partir de regressão linear, na comparação com uma curva padrão, gerada com quantidades conhecidas de DNA de *L. L. infantum* (MCAN/BR/2002/BH401), diluído sucessivamente na razão dez (10⁷ até 10¹ parasitos).

O procedimento descrito acima foi também realizado para a amplificação de fragmento do gene TNF- α de camundongos, utilizando os iniciadores (TNF-5241 5' TCCCTCTCATCAGTTCTATGGCCCA 3' e TNF-5411 5' CAGCA AGCATCTATGCACTTAGACCCC 3'), que amplificam fragmento de 170pb (CUMMINGS & TARLETON, 2003). O gene TNF- α é expresso de forma constitutiva em todas as células e por este motivo foi utilizado para verificar a integridade do DNA das amostras (BUSTIN et al., 2009).

Para a análise dos resultados foram consideradas reações com eficiência entre 90-110% e curva padrão com valores satisfatórios de coeficiente de correlação entre as diluições do DNA dos parasitos e o Ct ($r^2 = 0,96-0,999$) (BUSTIN et al., 2009).

4.6. Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, em programas de pacotes estatísticos GraphPad® Instat 5 (GraphPad Software Inc, EUA) e Origin® Pro 8.5 (OriginLab Corp, EUA).

Para calcular os valores de CI₅₀ e CC₅₀, foram feitas regressões não lineares das médias dos valores encontrados para cada concentração em, pelo menos, três experimentos independentes em triplicata.

O tipo de distribuição amostral foi verificado pelo teste de Kolmogorov-Smirnov.

Na análise da carga parasitária, foram procuradas diferenças entre o eugenol, a anfotericina b e grupo controle utilizando o teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltipla de Dunn's como *post-hoc*.

Em todos os testes foi observado um nível de significância de 5% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1. Atividade leishmanicida dos produtos naturais em promastigotas de *Leishmania infantum* e citotoxicidade em linhagem de hepatoma humano (HepG2)

A atividade leishmanicida do bisabolol, eugenol e lapachol foi determinada a partir da obtenção dos valores da concentração do produto natural ou da anfotericina b que reduziu em 50% o crescimento dos parasitos (CI₅₀). Do mesmo modo, a citotoxicidade para células HepG2 foi determinada a partir da concentração do produto natural ou do fármaco referência que reduziu em 50% a viabilidade celular (CC₅₀). O índice terapêutico (IT) para essas substâncias e para a anfotericina b foi calculado por meio da razão entre o CC₅₀ e CI₅₀ (**Tabela 1**).

Tabela 1 – Valores de CC₅₀ determinados para células HepG2, valores de CI₅₀ determinados para formas promastigotas de *Leishmania infantum* e índice terapêutico (IT) após incubação por 48 horas

Produto natural/ Fármaco referência	CI ₅₀ (μM)	CC ₅₀ (μM)	IT
Bisabolol	20,01 ± 1,84	1351,57 ± 13,28	67,54
Eugenol	34,53 ± 0,69	2183,58 ± 38,25	63,24
Lapachol	136,04 ± 8,02	3402,14 ± 63,43	25,00
Anfotericina b	0,056 ± 0,02	40,07 ± 1,58	715,53

CI₅₀ - promastigotas de *L. infantum* cepa MCAN/BR/2002/BH401

CC₅₀ – linhagem celular HepG2

IT – razão entre CC₅₀ e CI₅₀

Todos os produtos naturais testados apresentaram atividade contra *L. infantum*, além disso, com base no índice terapêutico, maior que 10 para todos os produtos naturais, pode-se afirmar que a ação desses foi seletiva para os parasitos.

5.2. Interação farmacológica dos produtos naturais com anfotericina b em promastigotas de *Leishmania infantum*

Todos os produtos naturais testados contra promastigotas apresentaram índice terapêutico (IT) maior do que 10. No entanto, foram selecionados o bisabolol e o eugenol, para os ensaios de interação farmacológica com promastigotas de *L. infantum*, por apresentarem

Resultados

os maiores índices terapêuticos. As **Tabela 2** e **3** mostra os resultados obtidos nesses ensaios, após 48 horas de incubação. Nos ensaios, a concentração inibitória fracionária (CIF) de cada combinação foi analisado e variou de 1,30 a 1,69 para a combinação anfotericina b e eugenol (**tabela 2**) e de 1,24 a 2,19 para a combinação anfotericina b e bisabolol (**tabela 3**). A média de Σ CIF foi de 1,50 para a associação do eugenol e anfotericina b e de 1,64 para a combinação da anfotericina b e o bisabolol. Conforme mostram as **Tabelas 2** e **3** as médias dos Σ CIF das combinações, 1,5 e 1,64 respectivamente, ficaram dentro da faixa de aditividade ou indiferença (Σ CIF entre 0,5 e ≤ 4).

Tabela 2 - Valores de CI_{50} , CIF, Σ CIF e $X\Sigma$ CIF da associação entre eugenol com anfotericina b promastigotas de *Leishmania infantum*

Proporções		CI_{50} (μ M)		CIF		Σ CIF	$X\Sigma$ CIF
Anf b	Eug	Anf b	Eug	Anfb	Eug	Anf b + eug	
5	0	0,054	-	-	-	-	
4	1	0,066	9,56	1,21	0,09	1,30	
3	2	0,066	25,21	1,21	0,23	1,45	
2	3	0,064	55,17	1,17	0,51	1,69	
1	4	0,039	90,31	0,71	0,85	1,56	
0	5	-	100,2	-	-	-	

Anf b – anfotericina b

Eug – Eugenol

Tabela 3 - Valores de CI_{50} , CIF, Σ CIF e $X\Sigma$ CIF da associação entre bisabolol com anfotericina b promastigotas de *Leishmania infantum*

Proporções		CI_{50} (μ M)		CIF		Σ CIF	$X\Sigma$ CIF
Anf b	Bisab	Anf b	Bisab	Anf b	Bisab	Anf b + Bisab	
5	0	0,054	-	-	-	-	
4	1	0,065	6,92	1,19	0,05	1,24	
3	2	0,072	20,32	1,32	0,15	1,47	
2	3	0,094	61,33	1,72	0,47	2,19	
1	4	0,052	89,94	0,95	0,69	1,64	
0	5	-	130,27	-	-	-	

Anf b – anfotericina b

Bisab – Bisabolol

A **Figura 8** apresenta as curvas de concentração dose-efeito referentes à inibição de promastigotas de *L. infantum* para diferentes proporções de combinação (5:0, 4:1, 3:2,

Resultados

2:3, e 1:4, 0:5) entre a anfotericina b e o eugenol, produto natural que apresentou a média Σ CIF mais próxima do sinergismo, totalizando seis curvas dose-resposta. De maneira geral observamos nas curvas mudança da direita para esquerda indicando uma redução nos valores de CI_{50} dos produtos testados quando em associação. A **Figura 9** mostra o isobolograma que representa a interação *in vitro* eugenol – anfotericina b contra promastigotas de *L. infantum*.

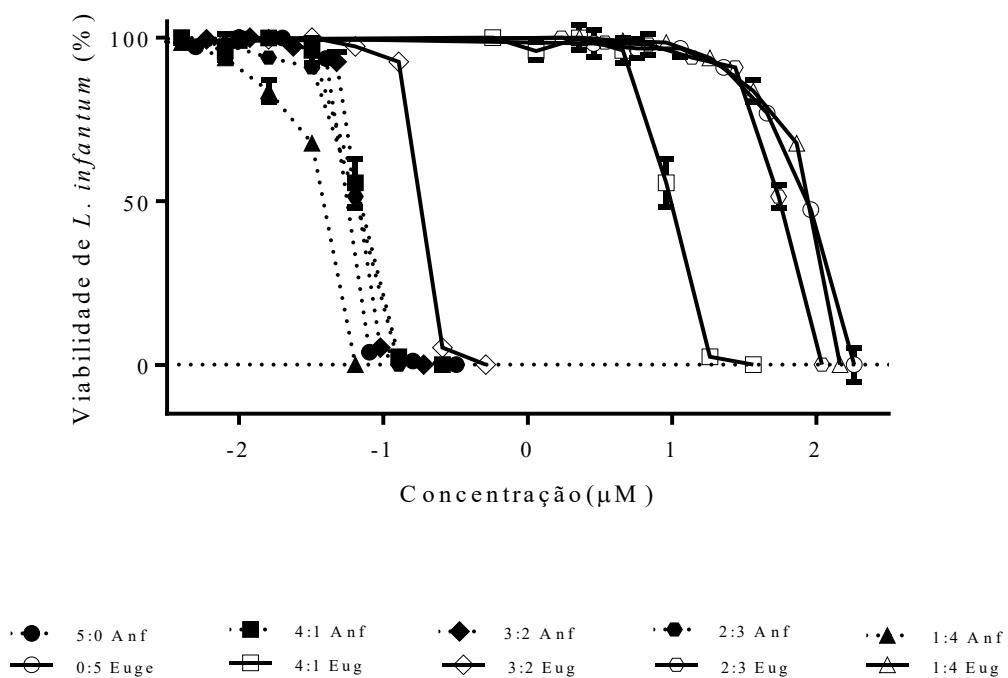


Figura 8 – Curvas de concentração dose-efeito referentes à inibição de promastigotas de *L. infantum* para diferentes combinações de anfotericina b e eugenol.

5.3 Eficácia terapêutica *in vivo*

Os dois produtos naturais selecionados (eugenol e bisabolol) para ensaio de interação farmacológica com promastigotas de *L. infantum*, apresentaram média do Σ CIF dentro da faixa de indiferença ou aditividade. Contudo o eugenol foi selecionado para ensaios de eficácia terapêutica *in vivo* por apresentar média do Σ CIF mais próxima do sinergismo. Por ser menos tóxico que a anfotericina b, a dose utilizada do eugenol foi fixada com base na literatura (ISLAMUDDIN et al., 2016). Para a associação reduziu-se a dose da anfotericina b a 20% (1mg/Kg/24h) daquela utilizada no tratamento padrão para o modelo

Resultados

murino utilizado neste trabalho (5mg/kg/24h) (MURRAY; HARIPRASHAD; FICHTL, 1996; MONZOTE-FIDALGO2 et al., 2015).

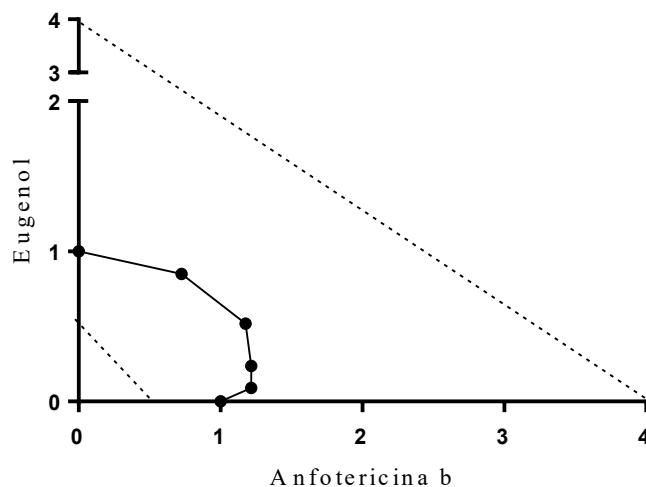


Figura 9– Isobograma representando interação *in vitro* da associação de anfotericina b e eugenol contra *L. infantum*. A linha segmentada representa a faixa teórica ideal para o efeito aditivo

Houve boa tolerância ao regime terapêutico, não havendo mudança no comportamento, no padrão alimentar ou ingestão de água durante todo o tratamento. Após o término do tratamento com os esquemas terapêuticos propostos, foi realizada a eutanásia dos animais. Não foram observadas alterações macroscópicas importantes durante a coleta do baço e fígado. A **Figura 10** mostra o impacto das terapias propostas sobre a carga parasitária no fígado e baço, determinada por qPCR.

O procedimento de infecção foi eficiente, os animais do grupo controle (grupo 5) apresentaram alta carga parasitária no fígado ($1,52 \times 10^5 \pm 3,52 \times 10^4$ *Leishmania*/mg) e no baço ($8,4 \times 10^4 \pm 2,53 \times 10^4$ *Leishmania*/mg). Houve redução da carga parasitária no fígado e baço na comparação entre os grupos tratados apenas com eugenol 75mg/kg ou apenas com anfotericina b 1mg/kg (subdosagem), em relação ao grupo controle, sendo que no grupo 1, tratado apenas com eugenol 75mg/kg a redução da carga parasitária foi maior que no grupo 2, porém essa diferença não foi significativa estatisticamente. No grupo tratado com a combinação eugenol 75mg/kg (*p.o.*) e anfotericina b 1mg/kg (*i.p.*) houve redução significativa da carga parasitária do baço ($p < 0,05$) e fígado ($p < 0,01$) em relação aos animais do grupo controle. Os resultados sugerem que a combinação entre anfotericina b e eugenol foi capaz de induzir redução média da carga parasitária do baço

Resultados

e do fígado em 91% e 94%, respectivamente, sendo que o número médio de parasitos por miligrama de baço ($7,8 \times 10^3$ *Leishmania*/mg) e fígado (9×10^3 *Leishmania*/mg) nos animais deste grupo, foi 10,8 e 16,9 vezes menor, que o determinado para o baço ($8,4 \times 10^4$ *Leishmania*/mg) e fígado ($1,52 \times 10^5$ *Leishmania*/mg) dos animais do grupo controle sem tratamento, respectivamente. De maneira similar, nos animais que foram tratados com a anfotericina b (controle positivo de tratamento) houve redução média da carga parasitária no baço (8×10^3 *Leishmania*/mg) e fígado ($4,5 \times 10^3$ *Leishmania*/mg) em 90,5% e 97%, respectivamente. O número médio de parasitos por miligrama de tecido foi 10,5 vezes menor no baço e 33,7 vezes menor no fígado do que o determinado nos animais do grupo controle. É importante notar que não houve diferença estatística entre a carga parasitária determinada no baço e fígado dos animais tratados com o protocolo referência (5m/kg/24h/10 dias) e os animais tratados com a associação de anfotericina b em sub-dose (1mg/kg/24h/ 10 dias) e eugenol (75mg/kg/p.o./24h/10 dias).

Resultados

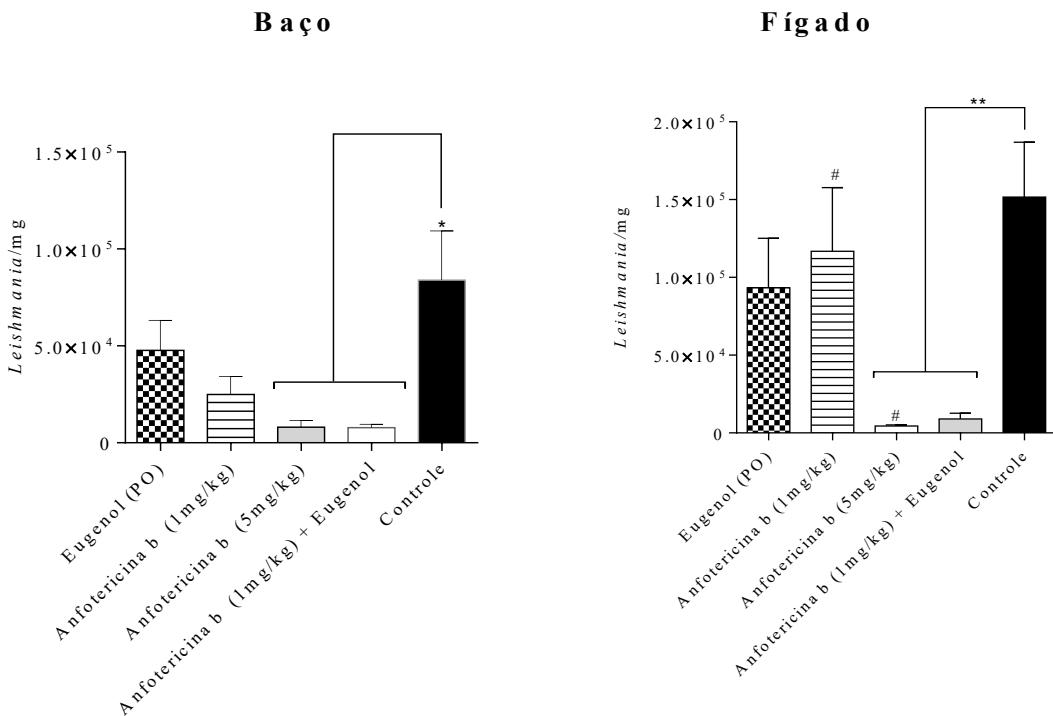


Figura 10 - Carga parasitária no baço e fígado de camundongos Balb/C infectados com 1×10^7 promastigotas de *Leishmania (L.) infantum*, após tratamento com anfotericina b, eugenol e a combinação entre essas drogas. Eugenol (75mg/kg/p.o./24h/10 dias). Anfotericina b desoxicolato (1mg/kg/ i.p./24h /10dias) foi usado como controle de subdosagem. Anfotericina b desoxicolato (5mg/kg/i.p./48h/10dias) foi utilizado como tratamento medicamentoso de referência (controle positivo de tratamento) e animais não tratados como controles de infecção. Carga parasitária determinada por qPCR como descrito em Material e Métodos. Os dados são apresentados como médias \pm EPM de cada grupo (n = 6). * p <0,05; #p <0,05; ** p <0,01, determinado pelo teste de Kruskal-Wallis, seguido do teste de comparação múltipla de Dunn como post-hoc.

6. DISCUSSÃO

A LV é uma doença negligenciada intimamente relacionada à pobreza. É a segunda doença parasitária que mata mais no mundo, ficando atrás apenas da malária. A OMS tem dispensado esforços com objetivo de reduzir a morbimortalidade e a prevalência da doença, principalmente em áreas endêmicas (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006; PACE, 2014). A OMS, assim como o Ministério da Saúde do Brasil, orienta o diagnóstico precoce e tratamento dos pacientes. Embora o controle não se baseie em única medida, a principal estratégia continua sendo o tratamento (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006; PACE, 2014).

Os antimoniais têm sido utilizados na terapêutica para LV há mais de 70 anos. O uso destes como primeira opção para o tratamento foi abandonado em algumas regiões endêmicas, após altas taxas de falha no tratamento (CHOUHAN et al., 2014; VAN GRIENSVEN et al., 2010). O fármaco de segunda escolha, o desoxicolato de anfotericina b, usado para tratar pacientes com contraindicação ou não responsivos a terapia com os antimoniais, apresenta necessidade de hospitalização, duração do tratamento prolongada, além da alta toxicidade. Parte das limitações do uso da anfotericina b foram superadas pelas formulações lipossomais, que apresentam reduzida a toxicidade, porém, possuem custo elevado. Sendo a terapia farmacológica a principal forma de controle da LV, são necessários esquemas terapêuticos mais eficazes (BRASIL, 2014; CHOUHAN et al., 2014; HAMILL, 2013; VAN GRIENSVEN et al., 2010).

As atuais terapias medicamentosas apresentam limitações, como toxicidade, elevado custo e seleção de parasitos resistentes, mas, são as únicas disponíveis. Este cenário estimula a busca por novos fármacos ou novas estratégias terapêuticas, como reposicionamento e associação de fármacos, sendo que esta última abordagem tem sido utilizada há algum tempo para doenças como tuberculose, HIV e mais recentemente, para a malária, na busca de contornar as limitações das terapias atuais (CORRAL et al., 2012; OLLIARO, 2010; VAN GRIENSVEN et al., 2010).

Um critério importante no desenvolvimento de novos fármacos com ação leishmanicida é a busca por substâncias com toxicidade menor que as drogas atualmente utilizadas (ORYAN, 2015). Devido a isso, além de avaliar a eficácia dos produtos naturais sobre *L. infantum* foi avaliada a citotoxicidade destes compostos, por MTT.

Discussão

Estudos prévios mostram baixa toxicidade às células pelo eugenol, sendo relatado ausência de toxicidade do eugenol em macrófagos murinos, células THP-1 modificadas, dentre outras, mesmo em concentrações elevadas deste produto natural (ISLAMUDDIN et al., 2016). No presente ensaio, o CC_{50} do eugenol foi de 2183,58 μ M, para as células HepG2, assim as concentrações utilizadas (2,03 μ M a 986,6 μ M) não apresentaram comprometimento e / ou modificação nas células. Esse resultado está de acordo a literatura, que sugere baixos níveis de toxicidade do eugenol linhagem de células HepG2 (toxicidade inicial a partir de 260 μ M) (YOO et al., 2005; YOUNG et al., 2006). O lapachol e o bisabolol também apresentaram citotoxicidade relativamente baixa em HepG2 (COSTA et al., 2017; ROCHA et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2001).

Trabalhos anteriores mostram atividade leishmanicida de produtos naturais, Corpas-López et al. (2015) apresentam ensaios *in vitro* e *in vivo*, com o uso de bisabolol, com inibição de crescimento dos parasitos e redução da carga parasitária nos modelos de infecção, assim como Teixeira et al. (2001) e Dutra et al. (2017) demonstraram em seus trabalhos atividade contra *Leishmania* usando lapachol e eugenol (CORPAS-LÓPEZ et al., 2015; DUTRA et al., 2016; ISLAMUDDIN et al., 2016; TEIXEIRA et al., 2001).

Os resultados obtidos neste estudo demonstram que todos os produtos naturais testados apresentaram atividade contra as formas promastigotas e baixa citotoxicidade, resultando em $IT \geq 10$. Assim o eugenol, o bisabolol e o lapachol foram considerados com atividade seletiva contra *L. infantum*, *in vitro*. Como os resultados de $IT > 10$ sugerem que estas substâncias são promissoras contra *L. infantum*, estudos devem ser realizados para verificar sua eficácia *in vivo*.

A combinação e reposicionamento de drogas é considerada uma abordagem promissora, por causa dos benefícios que ela pode proporcionar (SEIFERT; CROFT, 2006). O melhor resultado de combinação para este ensaio foi a proporção de 1 parte de anfotericina b para 4 partes de eugenol, quando sozinha a anfotericina b apresentou o CI_{50} de 0,051 μ M, quando associada ao eugenol reduziu em 28% o CI_{50} da anfotericina b em relação a utilização desta isoladamente. Ao reduzir a dose terapêutica de determinado medicamento, provavelmente, reduz-se a toxicidade relacionada ao seu uso (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006).

Discussão

Os valores do índice de combinação (Σ CIF) que expressam a extensão da interação, variaram de 1,31 a 1,69 para a combinação anfotericina b e eugenol, e de 1,25 a 2,22 para a combinação anfotericina b e bisabolol, ambos sendo considerados como efeito aditivo ou indiferente. Da mesma maneira os valores médios de $X\Sigma$ CIF (1,51 para o eugenol:anfotericina b e 1,65 para o bisabolol:anfotericina b), estavam dentro da faixa de aditividade ou indiferença (ODDS, 2003; MESQUITA et al., 2014).

A terapia de combinação de drogas vem sendo utilizada para tratar diversas doenças como câncer, tuberculose e malária, e tem se mostrado uma abordagem mais eficaz do que a monoterapia. Seifert e Croft (2005) associaram drogas utilizadas convencionalmente em monoterapia para LV, enquanto outros autores como Tiwari *et al* (2017), Corral *et al* (2014) e Stepanović *et al* (2003) avaliaram, *in vitro*, a combinação de produtos naturais com drogas referencias para o tratamento de LV e outras doenças, com bons resultados na análise das combinações pelo método do isobolograma.

Os resultados de combinação da anfotericina b, droga referência, com produtos naturais (eugenol e bisabolol) apresentados neste trabalho, reforçam a tendência atual de abordagem terapêutica baseada na associação de compostos para o tratamento da LV. Além disso, utilizar combinação de drogas e produtos naturais, pouco tóxicos e de baixo custo de obtenção e preparo, que possuem mecanismos de ação diferentes seria uma opção promissora a ser explorada para o tratamento da LV, visando aumentar a eficácia e minimizar a possibilidade de seleção de parasitos resistentes.

Após avaliação dos resultados dos ensaios *in vitro*, o eugenol foi selecionado para o ensaio de avaliação terapêutica *in vivo*, por apresentar o valor da média $X\Sigma$ CIF mais próximo do sinergismo. Além disso, a literatura sugere que o eugenol apresenta ação leishmanicida *in vivo*, indução da imunidade celular, é bem tolerado e não induz toxicidade hepática ou renal nos animais, endossando os resultados obtidos em culturas de célula. (ISLAMUDDIN et al., 2016)

O esquema terapêutico escolhido foi bem tolerado, os animais não apresentaram alteração no comportamento, padrão alimentar e ingestão de água durante todo o tratamento, também não foram observadas lesões macroscópicas nos órgãos, após a eutanásia. Os ensaios de associação de drogas buscam aumento da eficácia terapêutica, mas há a preocupação da potencialização de efeitos colaterais das drogas associadas, como a toxicidade hepática e

Discussão

renal. Com o objetivo de avaliar a toxicidade hepática e renal, amostras de plasma foram colhidas no momento da eutanásia para posterior determinação dos níveis séricos das transaminases hepáticas, proteínas totais e frações, uréia e creatinina.

Trabalhos de associação de fármacos, em diferentes modelos de doenças, tem obtido resultados promissores como de Corral *et al* (2014), Tiwari *et al* (2017) ou Wang, Kong e Ma (2018), sugerindo a adoção de novos regimes terapêuticos mais eficazes. Nossa pesquisa demonstrou de forma inédita que a associação da anfotericina b na concentração de 1mg/Kg com eugenol 75mg/Kg foi capaz de obter resultado semelhante ao tratamento com anfotericina b 5mg/Kg (terapia de referência) em modelo murino de LV. Demonstramos que esta proposta terapêutica foi capaz de induzir redução significativa na carga parasitária no baço e fígado dos animais tratados, quando comparados com o grupo controle. De maneira surpreendente, os resultados da associação na redução de carga parasitária nestes órgãos foram semelhantes aos obtidos pelo tratamento padrão, que usa doses de anfotericina b de 5mg/kg, cinco vezes maior que quando usada em associação com o eugenol (1mg/kg). Esses resultados sugerem, um efeito aditivo ou sinérgico entre a anfotericina b e o eugenol para o tratamento da LV, confirmando os resultados obtidos nos ensaios *in vitro*.

Mais pesquisas são necessárias com objetivo de verificar a dose ideal para a combinação e mecanismo de ação da associação, que nos permita propor um esquema terapêutico mais eficaz para o tratamento da LV. Entretanto, nossos resultados sugerem que a abordagem baseada na associação de fármacos e produtos naturais pode ser uma maneira de reduzir a dose de anfotericina b de forma eficaz e segura, por reduzir a sua toxicidade, mantendo ou maximizando seu efeito terapêutico, para o tratamento da LV.

7. CONCLUSÕES

- Os produtos naturais eugenol, bisabolol e lapachol apresentaram atividade contra *L. infantum*;
- Os produtos naturais eugenol, bisabolol e lapachol apresentaram baixa citotoxicidade;
- Todos os produtos naturais apresentaram IT maior que 10 para a espécie testada;
- O bisabolol e o eugenol apresentaram efeito aditivo/indiferente para a associação com anfotericina b em promastigotas de *L. infantum*;
- A associação entre eugenol 75mg/kg com sub dose de anfotericina b 1mg/Kg apresentou redução significativa na carga parasitária no fígado e no baço de camundongos com leishmaniose visceral após o tratamento, em relação ao grupo não tratado, sendo a redução semelhante a obtida utilizando o tratamento convencional de referência (anf b 5mg/Kg).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHMAD, A. et al. Synergistic interactions of eugenol-Tosylate and its congeners with fluconazole against *candida albicans*. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–19, 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145053>

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitology**, v. 22, n. 12, p. 552–557, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.09.004>

BATES, P. A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1097–1106, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.003>

BALASSIANO I.T.; DE PAULO, S.A.; SILVA, N.H.; CABRAL, M.C.; CARVALHO, M.C.; Demonstration of the lapachol as a potential drug for reducing câncer metastasis. **Oncology Reports**, v.13, p.329–33, 2005. <https://doi.org/10.3892/or.13.2.329>

BÉZIVIN, C. et al. Cytotoxic activity of some lichen extracts on murine and human cancer cell lines. **Phytomedicine**, v. 10, n. 6–7, p. 499–503, jan. 2003. <https://doi.org/10.1078/094471103322331458>

BRASIL. **Leishmaniose Visceral Grave**. Brasília: Ministério da Saúde, 2006.

BRASIL. **Leishmaniose Visceral - Recomendações clínicas para redução da letalidade**. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. **Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. **DATASUS-SVS - Sistema de Agravos de Notificação - SINAN NET**. Disponível [em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/leishvbr.def>](http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/leishvbr.def). Acesso em: 6 maio. 2018.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of

Referências Bibliográficas

quantitative real-time PCR experiments. **Clinical chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–22, abr. 2009. <https://doi.org/10.1373/clinchem.2008.112797>

CASTRO, S.L.; EMERY, F.S.; DA SILVA JUNIOR, E.N. Synthesis of 2,3- unsaturated O-glycosides: $\text{TeCl}_3(\text{OTf})$ as the catalyst for type I Ferrier rearrangement. **Tetrahedron**, v.69, p. 4524-4531, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.tet.2013.04.051>

CDC. **Parasites** – **Leishmaniasis**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html>>. Acesso em: 12 mar. 2108.

CHOU, T. C. Theoretical basis, experimental design, and computerized simulation of synergism and antagonism in drug combination studies. **Pharmacological Reviews**, v. 58, n. 3, p. 621–681, set. 2006. <https://doi.org/10.1124/pr.58.3.10>

CHOUHAN, G. et al. Exploring the role of medicinal plant-based immunomodulators for effective therapy of leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 1–7, 2014. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2014.00193>

CORPAS-LÓPEZ, V. et al. (–)- α -Bisabolol, a Promising Oral Compound for the Treatment of Visceral Leishmaniasis. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 6, p. 1202–1207, 26 jun. 2015. <https://doi.org/10.1021/np5008697>

CORRAL-CARIDAD, M. J. et al. Effect of allicin on promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania donovani* and *L. infantum*. **Experimental Parasitology**, v. 132, n. 4, p. 475–482, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.08.016>

CORRAL, M. J. et al. Effect of allicin on promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania donovani* and *L. infantum*. **Experimental parasitology**, v. 132, n. 4, p. 475–482, 2012. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.08.016>

CORRAL, M. J. et al. Improvement of 96-well microplate assay for estimation of cell growth and inhibition of *Leishmania* with Alamar Blue. **Journal of Microbiological Methods**, v. 94, n. 2, p. 111–116, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.mimet.2013.05.012>

COSTA, E. V. S. et al. Antileishmanial Activity of *Handroanthus serratifolius* (Vahl) S.

Referências Bibliográficas

Grose (Bignoniaceae). **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2017, 2017. <https://doi.org/10.1155/2017/8074275>

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis Drug Resistance in Leishmaniasis. **Society**, v. 19, n. 1, p. 111–126, 2006.

CURATOLO, M.; SVETICIC, G. Drug combinations in pain treatment: A review of the published evidence and a method for finding the optimal combination. **Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology**, v. 16, n. 4, p. 507–519, 2002. <https://doi.org/10.1053/bean.2002.0254>

DA SILVA, M.N.; FERREIRA, V.F.; de SOUZA, M.C.B.V. Um panorama atual da química e da farmacologia de naftoquinonas, com ênfase na β-lapachona e derivados. **Química Nova**, v. 26, n. 3, p. 407-416, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0100-40422003000300019>

DEGRAVE, W. et al. **Use of molecular probes and PCR for detection and typing of Leishmania - a mini-review** **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 1994. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12055821>>

DESJEUX, P. The increase in risk factors for leishmaniasis worldwide. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 3, p. 239–243, 2001. [https://doi.org/10.1016/S0035-9203\(01\)90223-8](https://doi.org/10.1016/S0035-9203(01)90223-8)

DESJEUX, P. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, v. 27, n. 5, p. 305–318, 2004. <https://doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004>

DUTRA, F. L. et al. Effects of linalool and eugenol on the survival of *Leishmania (L.) infantum chagasi* within macrophages. **Acta Tropica**, v. 164, p. 69–76, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2016.08.026>

DUTTA, A. et al. Development of a modified MTT assay for screening antimonial resistant field isolates of Indian visceral leishmaniasis. **Parasitology International**, v. 54, n. 2, p. 119–122, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2005.01.001>

Referências Bibliográficas

FERREIRA, V.F. Extração do lapachol da serragem do Ipê. QUÍMICA NOVA NA ESCOLA Conceitos de Ácido e Base n° 4, Novembro, 1996.

FIVELMAN, Q. L.; ADAGU, I. S.; WARHURST, D. C. Modified fixed-ratio isobologram method for studying in vitro interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 11, p. 4097–4102, 2004. <https://doi.org/10.1128/AAC.48.11.4097-4102.2004>

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, v. 35, n. 11–12, p. 1169–1180, 2005. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2005.07.001>

GUERRA, M. P.; NODARI, R. O. Biodiversidade: aspectos biológicos, geográficos, legais e éticos. In: **Farmacognosia: da planta ao medicamento**. Porto Alegre: UFRGS, 2011. p. 927.

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

HAMILL, R. J. Amphotericin B formulations: A comparative review of efficacy and toxicity. **Drugs**, v. 73, n. 9, p. 919–934, 2013. <https://doi.org/10.1007/s40265-013-0069-4>

HARHAY, M. O. et al. Urban parasitology: visceral leishmaniasis in Brazil. **Trends in Parasitology**, v. 27, n. 9, p. 403–409, set. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.pt.2011.04.001>

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19–20, p. 894–901, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2008.07.004>

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drug discovery in the genomics era. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 14, n. 2, p. 111–129, 2015. <https://doi.org/10.1038/nrd4510>

ISLAMUDDIN, M. et al. Immunotherapeutic Potential of Eugenol Emulsion in

Referências Bibliográficas

Experimental Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 10, p. 1–23, 2016. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0005011>

KAMATOU, G. P.; VERMAAK, I.; VILJOEN, A. M. Eugenol - From the remote Maluku Islands to the international market place: A review of a remarkable and versatile molecule. **Molecules**, v. 17, n. 6, p. 6953–6981, 2012. <https://doi.org/10.3390/molecules17066953>

KAMATOU, G.P.P., VILJOEN, A.M. A review of the application and pharmacological properties of α -bisabolol and α -bisabolol-rich oils. **J Am Oil Chem Soc**, v.87, p. 1-7, 2010. <https://doi.org/10.1007/s11746-009-1483-3>

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: Complexity at the host-pathogen interface. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2608>

LAINSON, R.; SHAW, J. . Evolution, classificacion and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. (Eds.). . **The leishmaniasis in biology and medicine**. London: Academic Press, 1987. p. 550.

MARCHESE, A. et al. Antimicrobial activity of eugenol and essential oils containing eugenol: A mechanistic viewpoint. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 43, n. 6, p. 668–689, 2017. <https://doi.org/10.1080/1040841X.2017.1295225>

MESQUITA, J. T. et al. Activity of imidazole compounds on *Leishmania* (L.) infantum chagasi: Reactive oxygen species induced by econazole. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 389, n. 1–2, p. 293–300, 2014. <https://doi.org/10.1007/s11010-013-1954-6>

MESQUITA, J. T.; TEMPONE, A. G.; REIMÃO, J. Q. Combination therapy with nitazoxanide and amphotericin B, Glucantime®, miltefosine and sitamaquine against *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum* intracellular amastigotes. **Acta Tropica**, v. 130, n. 1, p. 112–116, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2013.11.003>

MILADI, H. et al. Use of carvacrol, thymol, and eugenol for biofilm eradication and

Referências Bibliográficas

resistance modifying susceptibility of *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium* strains to nalidixic acid. **Microbial Pathogenesis**, v. 104, p. 56–63, 2017. <https://doi.org/10.1016/j.micpath.2017.01.012>

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1–2, p. 55–63, dez. 1983. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

MÜLLER, K.; SELLMER, A.; WIEGREBE, W. Potential antipsoriatic agents: lapachol compounds as potent inhibitors of HaCaT cell growth. **The Journal of Natural Product**, v.62, p. 1134–6, 1999. <https://doi.org/10.1021/np990139r>

MURRAY, H. W.; HARIPRASHAD, J.; FICHTL, R. E. Models of relapse of experimental visceral leishmaniasis. **The Journal of infectious diseases**, v. 173, n. 4, p. 1041–3, abr. 1996. <https://doi.org/10.1093/infdis/173.4.1041>

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs from 1981 to 2014. **Journal of Natural Products**, v. 79, n. 3, p. 629–661, 25 mar. 2016. <https://doi.org/10.1021/acs.jnatprod.5b01055>

ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 52, n. 1, p. 1–1, 2003. <https://doi.org/10.1093/jac/dkg301>

OLIVEIRA, A.B.; RASLAN, D.S.; MIRAGLIA, M.C.M.; MESQUITA, A.A.L., ZANI, C.L.; FERREIRA, D.T.; MAIA J.G.S. Estrutura química e atividade biológica de naftoquinonas de Bignoniacées brasileiras. **Química Nova**, v. 13, p. 302-307, 1990.

OLLIARO, P. L. Drug combinations for visceral leishmaniasis. **Current Opinion in Infectious Diseases**, v. 23, n. 6, p. 595–602, 2010. <https://doi.org/10.1097/QCO.0b013e32833fca9d>

OPAS. Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas. **Informe Leishmanioses**, v. 2, p. 1–4, 2014.

OPREA, T. I.; MESTRES, J. Drug Repurposing: Far Beyond New Targets for Old Drugs.

Referências Bibliográficas

The AAPS Journal, v. 14, n. 4, p. 759–763, 2012. <https://doi.org/10.1208/s12248-012-9390-1>

ORYAN, A. Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 1–19, 2015.

ORYAN, A.; AKBARI, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 10, p. 925–932, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.apjtm.2016.06.021>

PACE, D. Leishmaniasis. **Journal of Infection**, v. 69, n. S1, p. S10–S18, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.016>

RISS, T. L. et al. **Cell Viability Assays**. [s.l.] Promega Corporation, 2004.

ROCHA, M. N. et al. Cytotoxicity and In Vitro Antileishmanial Activity of Antimony (V), Bismuth (V), and Tin (IV) Complexes of Lapachol. **Bioinorganic Chemistry and Applications**, v. 2013, p. 1–7, 2013. <https://doi.org/10.1155/2013/961783>

RODRIGUES, I. A. et al. Natural Products: Insights into Leishmaniasis Inflammatory Response. **Mediators of Inflammation**, v. 2015, 2015.

SALES, M. D. C.; SARTOR, E. B.; GENTILLI, R. M. Ethnobotany and ethnopharmacology: traditional medicine and the bioprospection of phytotherapics. **Salus Journal of Health Sciences**, v. 1, n. 1, 2015.

SEIFERT, K.; CROFT, S. L. In Vitro and In Vivo Interactions between Miltefosine and Other Antileishmanial Drugs. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, n. 1, p. 73–79, 2006. <https://doi.org/10.1128/AAC.50.1.73-79.2006>

SIFONTES-RODRÍGUEZ, LIANET MONZOTE-FIDALGO, N. C.-C. et al. The efficacy of 2-nitrovinylfuran derivatives against Leishmania in vitro and in vivo. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 2, p. 166–173, 2015.

SUNDAR, S.; AGARWAL, D. Visceral leishmaniasis – Optimum treatment options in children. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, p. 1, dez. 2017.

Referências Bibliográficas

SUNDAR, S.; CHAKRAVARTY, J. Investigational drugs for visceral leishmaniasis. **Expert opinion on investigational drugs**, v. 24, n. 1, p. 43–59, 2015. <https://doi.org/10.1517/13543784.2014.954035>

TALLARIDA, R. J. Revisiting the Isobole and Related Quantitative Methods for Assessing Drug Synergism. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 342, n. 1, p. 2–8, 2012. <https://doi.org/10.1124/jpet.112.193474>

TEIXEIRA, M. J. et al. In vitro and in vivo Leishmanicidal activity of 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone (lapachol). **Phytotherapy research : PTR**, v. 15, n. 1, p. 44–8, fev. 2001.

TIPHINE, M.; LETSCHER-BRU, V.; HERBRECHT, R. Amphotericin B and its new formulations: pharmacologic characteristics, clinical efficacy, and tolerability. **Transplant infectious disease : an official journal of the Transplantation Society**, v. 1, n. 4, p. 273–283, dez. 1999.

UEDA-NAKAMURA, T. et al. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from Ocimum gratissimum. **Parasitology International**, v. 55, n. 2, p. 99–105, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2005.10.006>

VAN GRIENSVEN, J. et al. Combination therapy for visceral leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 10, n. 3, p. 184–194, 2010. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70011-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70011-6)

VON STEBUT, E. Leishmaniasis. **JDDG: Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 13, n. 3, p. 191–201, 2015. https://doi.org/10.1111/ddg.12595_suppl

WHO. WHO Traditional Medicine Strategy 2014-2023. **World Health Organization (WHO)**, p. 76, 2013.

WHO. Weekly epidemiological record. **World Health Organization**, v. 38, n. 92, p. 557–572, 2017.

WHO. **Leishmaniasis fact sheet**. Disponível em: <http://www.euro.who.int/__data/assets/pdf_file/0007/246166/Fact-sheet-

Referências Bibliográficas

Leishmaniasis-Eng.pdf?ua=1>. Acesso em: 21 mar. 2018.

YOO, C.-B. et al. Eugenol isolated from the essential oil of *Eugenia caryophyllata* induces a reactive oxygen species-mediated apoptosis in HL-60 human promyelocytic leukemia cells. **Cancer letters**, v. 225, n. 1, p. 41–52, 8 jul. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2004.11.018>

YOUNG, S. C. et al. Increased sensitivity of Hep G2 cells toward the cytotoxicity of cisplatin by the treatment of piper betel leaf extract. **Archives of Toxicology**, v. 80, n. 6, p. 319–327, 2006. <https://doi.org/10.1007/s00204-005-0051-3>

ZHANG, C.; QU, Y.; NIU, B. Design, synthesis and biological evaluation of lapachol derivatives possessing indole scaffolds as topoisomerase I inhibitors. **Bioorg Med Chem**, v. 15, n. 24, p. 5781-5786, 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2016.09.034>

ZIJLSTRA, E. E. PKDL and Other Dermal Lesions in HIV Co-infected Patients with Leishmaniasis: Review of Clinical Presentation in Relation to Immune Responses. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 11, 2014. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0003258>

ANEXOS

Anexo 1



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa
Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail:ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

**ANÁLISE FINAL Nº 119/13 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 069/13**

Projeto Pesquisa: “Formulação inovadora de lipossomas convencionais e furtivos contendo miltefosina e antimoniato de meglumina para o tratamento da leishmaniose visceral”.

Pesquisador Responsável: Sydnei Magno da Silva

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 24 de Junho de 2013