

Universidade Federal de Sergipe
Pró-reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa
Mestrado em Biologia Parasitária

Atividade Leishmanicida do Extrato Etanólico Bruto de
***Croton blanchetianus* Bail**

Katily Luize Garcia Pereira

São Cristóvão

2014

Katily Luize Garcia Pereira

**Atividade Leishmanicida do Extrato Etanólico Bruto de
Croton blanchetianus Baill**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Biologia Parasitária da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária, na área de concentração em Biologia Parasitária.

Orientador: Dr. Ricardo Scher

SÃO CRISTÓVÃO

SERGIPE – BRASIL

2014

Katily Luize Garcia Pereira

**Atividade Leishmanicida do Extrato Etanólico Bruto de
Croton blanchetianus Baill**

Dissertação apresentada ao Núcleo de Pós-Graduação em Biologia Parasitária da Universidade Federal de Sergipe como requisito à obtenção do título de Mestre em Biologia Parasitária, na área de concentração em Biologia Parasitária.

APROVADA em 04 de agosto de 2014

Prof. Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral – FIOCRUZ–RJ

Prof. Dr. Silvio Santana Dolabella – UFS

Prof. Dr. Ricardo Scher
UFS
(Orientador)

**SÃO CRISTÓVÃO
SERGIPE – BRASIL**

*Busquei o SENHOR, e ele me acolheu;
livrou-me de todos os meus temores.
Contemplai-o e sereis iluminados, e o vosso
rosto jamais sofrerá vexame.*

Salmos 34: 4-5

DEDICATÓRIA

Dedico esta dissertação ao meu querido Deus que me sustentou com a Sua poderosa destra, mostrando-me que os Seus pensamentos são mais altos do que os meus (Toda honra e toda glória sejam dadas a Ti, Jesus!);

Ao meu pai Manoel Pereira, meu maior exemplo de esforço, caráter e honestidade;

À minha mãe Gilvanete Garcia por me inspirar com sua sabedoria e ser meu porto seguro;

Ao meu amado esposo Neto Campos pelo apoio, companheirismo e compreensão;

Ao meu irmão William Garcia, meu exemplo de fé;

À minha cunhada Moara Lima por ser um exemplo de determinação;

À minha melhor amiga Jozélia Venceslau por me incentivar e estar ao meu lado incondicionalmente;

Aos meus pequenos amores: Arnaldo, Gustavo e Lídia Raquel por alegrarem a minha vida com sua existência;

À minha tia Isabel por sonhar com este mestrado antes mesmo de mim;

A todos os meus amigos pelas constantes orações.

Amo todos vocês!!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente ao meu orientador **Dr. Ricardo Scher**, por confiar em mim e me dar a oportunidade de subir esse importante degrau na minha vida profissional, pela paciência na orientação, pelos ensinamentos transmitidos e pelos bons momentos compartilhados;

À minha co-orientadora, **Dr.^a Roberta Pereira**, pela extrema paciência em me ensinar os protocolos e pela compreensão nos meus momentos de desânimo;

Ao **Dr. Elmo Eduardo De Almeida Amaral** pela gentileza e atenção que me deu ao me receber em seu laboratório (LBqT - FIOCRUZ), ensinando-me calmamente cada protocolo e incentivando-me a continuar nesta linda, porém árdua carreira acadêmica;

Ao meu novo amigo **Job Inácio** por ter me ajudado em todos os meus experimentos, pela compreensão, apoio, bondade, cuidado. Se Deus não te usasse eu não teria conseguido concluir o meu mestrado (TMJ!!!);

A todos os meus novos colegas do LBqT - FIOCRUZ, pela compreensão e hospitalidade;

À minha amiga **Ana Nery** pelo apoio, conselhos e por compartilhar comigo dos mesmos momentos de tristeza e alegria nesse mestrado;

Às minhas colegas de laboratório **Flaviane** (em especial), **Juliana**, **Jaltaíra** e **Nancy** por toda ajuda e apoio;

Aos meus colegas de mestrado **Alda**, **Alan**, **Aline**, **Israel**, **Mariana**, **Mônica**, **Mércia** e **Tiago** pelos bons momentos de descontração;

Aos queridos professores do PROBP, em especial ao **Dr. Sílvio Dolabella**, por toda ajuda;

À equipe **Portela**, pela compreensão e incentivo;

Aos meus queridos **alunos** por me ensinarem na prática o que de fato é ser mestre!

PEREIRA, K. L. G.; SCHER, R. **Atividade leishmanicida do extrato etanólico bruto de *Croton blanchetianus* Baill.** (Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biologia Parasitária), 2014.

RESUMO

A leishmaniose é um complexo de doenças parasitárias causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e transmitidas ao ser humano e outros hospedeiros vertebrados por meio da picada de um inseto flebotomíneo infectado. Atualmente, todos os medicamentos utilizados no tratamento dessa doença apresentam baixa eficácia, alta toxicidade e estão associados à resistência parasitária. Nesse sentido, pesquisas científicas que indiquem novos compostos com atividade leishmanicida são bastante promissoras. O objetivo deste trabalho foi avaliar *in vitro* a atividade leishmanicida do extrato etanólico bruto de *C. blanchetianus* sobre *L. amazonensis* e *L. infantum*, bem como o seu efeito tóxico e imunomodulador sobre macrófagos murinos. Promastigotas na fase logarítmica de crescimento foram submetidos ao tratamento com diferentes concentrações do extrato por 24 e 72 horas a 26°C, e a viabilidade foi mensurada por meio do método de Alamar Blue™. Uma maior inibição foi vista em *L. amazonensis* com um IC₅₀ de 73,6 µg/ml em 24 horas de incubação e de 42,6 µg/ml em 72 horas. Em *L. infantum* o extrato apresentou um IC₅₀ de 208,7 µg/ml em 24 horas e de 108,9 µg/ml em 72 horas. Em relação à redução da viabilidade, *L. amazonensis* apresentou um percentual de morte de 68,8%, com 100 µg/ml do extrato, em 24 horas de tratamento e aproximadamente 100% em 72 horas, enquanto que em *L. infantum* este nível de inibição só foi visto com 250 µg/ml do extrato. Para a análise da atividade anti-amastigota, macrófagos infectados foram tratados com diferentes concentrações do extrato e incubados por 72h a 37°C, e o índice de infecção foi determinado por coloração com corante hematológico e contagem em microscopia óptica. Verificou-se uma inibição dose-dependente maior em *L. amazonensis* com um IC₅₀ de 3,10 µg/ml. Em *L. infantum* houve uma menor atividade do extrato que apresentou um IC₅₀ de 8,83 µg/ml. Na menor concentração testada (3 µg/ml) houve uma redução na viabilidade de *L. amazonensis* por volta de 44%, enquanto que em *L. infantum*, este nível de inibição só foi observado com 7 µg/ml do extrato. A avaliação da citotoxicidade foi realizada em macrófagos murinos, incubados com diferentes concentrações do extrato por 72h a 37°C e a viabilidade foi mensurada pelo método de Alamar Blue™. O LD₅₀ observado foi de 83,79 µg/ml e o Índice de Seletividade calculado foi de 27 para *L. amazonensis* e 9,5 para *L. Infantum*, revelando uma maior toxicidade do extrato nos parasitos do que nos macrófagos. O tratamento com o extrato não modulou o macrófago para a síntese de óxido nítrico, como verificado pela Reação de Griess. Contudo, interferiu na morfologia das formas promastigotas, sendo observados parasitos com corpo arredondado e/ou flagelo duplo. Portanto, os dados apresentados nesse estudo indicam que o extrato etanólico de *C. blanchetianus* apresenta atividade leishmanicida sobre as formas promastigota e amastigota de *L. amazonensis* e *L. infantum*, sendo mais efetivo frente à espécie *L. amazonensis*, principalmente sobre a forma amastigota, sem causar, no entanto, toxicidade à célula hospedeira.

Palavras-chave: atividade leishmanicida; *C. blanchetianus*; extrato etanólico; *L. amazonensis*; *L. chagasi*.

Orientador: Dr. Ricardo Scher, Laboratório de Biologia Celular e Molecular de *Leishmania*, Universidade Federal de Sergipe

PEREIRA, K.L.G.; SCHER, R. **Leishmanicidal activity of the crude ethanol extract of *Croton blanchetianus* Baill.** (Master's thesis submitted to the Postgraduate Parasitic Biology Program), 2014.

ABSTRACT

Leishmaniasis is a complex of parasitic diseases caused by protozoa of the genus *Leishmania* and transmitted to humans and other vertebrate hosts through the bite of an infected phlebotomine insect. Currently, all drugs used in the treatment of this disease have low efficacy, high toxicity and are associated with parasitic resistance. In this sense, scientific research that indicates a new compounds with leishmanicidal activity are quite promising. The objective of this study was to evaluate in vitro the leishmanicidal activity of the crude ethanol extract of *C. blanchetianus* on *L. amazonensis* and *L. infantum* as well as their toxic and immunomodulator effect on murine macrophages. Promastigotes in the logarithmic growth phase were subjected to treatment with different concentrations of the extract for 24 and 72 hours at 26°C, and the viability was measured by the method of Alamar Blue™. A greater inhibition was observed in *L. amazonensis* with an IC₅₀ of 73.6 µg/ml in 24 hours of incubation and 42.6 µg/ml at 72 hours. In *L. infantum* extract showed an IC₅₀ of 208.7 µg/ml in 24 hours and 108.9 µg/ml at 72 hours. Regarding the reduction of viability, *L. amazonensis* showed a death percentage of 68.8% with 100 µg/ml of the extract after 24 hours of treatment and approximately 100% after 72 hours, whereas for *L. infantum* this level of inhibition was not seen with 250 µg/ml of the extract. For the analysis of anti-amastigote activity, infected macrophages were treated with different concentrations of the extract and incubated for 72h at 37° C, and the rate of infection was determined by staining method with hematologic pigment and counts in optical microscopy. It was found a higher dose-dependent inhibition in *L. amazonensis* with an IC₅₀ of 3.10 µg/ml. In *L. infantum* there was a lower activity of the extract which present an IC₅₀ of 8.83 µg/ml. At lower concentration tested (3 µg/ml) there was a reduction in the viability of *L. amazonensis* around 44%, while in *L. infantum*, this level of inhibition was only observed with 7 µg/ml of extract. The cytotoxicity was performed on murine macrophages incubated with different concentrations of the extract for 72 hours at 37°C and the viability was measured by Alamar Blue™ method. The LD₅₀ observed was 83.79 µg/ml and the selectivity index calculated was 27 to *L. amazonensis* and 9.5 for *L. Infantum*, revealing a higher toxicity of the extract in the parasites than in macrophages. Treatment with the extract not modulated the macrophage for nitric oxide synthesis, as verified by Griess reaction. However, interfered in the morphology of promastigote forms, being observed parasites with a rounded body and/or double scourge. Therefore, the data presented in this study indicate that the ethanol extract of *C. blanchetianus* presents leishmanicidal activity on promastigote and amastigote forms of *L. amazonensis* and *L. infantum*, being more effective against the species *L. amazonensis*, especially on the amastigote form, without causing, however, toxicity to the host cell.

Keywords: *C. blanchetianus*; leishmanicidal activity; ethanol extract; *L. amazonensis*; *L. chagasi*.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1 LEISHMANIAS	4
2.1.1 Taxonomia	4
2.1.2 Ciclo biológico	6
2.1.3 Reservatórios e vetores	8
2.2 LEISHMANIOSES	11
2.2.1 LTA e sua epidemiologia	11
2.2.2 LV e sua epidemiologia	15
2.2.3 Resposta imune	19
2.3 TRATAMENTO	20
2.3.1 Antimoniais pentavalentes	21
2.3.2 Anfotericina B e Anfotericina B lipossomal	22
2.3.3 Pentamidina	23
2.3.4 Miltefosina	24
2.3.5 Paromomicina	24
2.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA	25
2.5 PRODUTOS NATURAIS	27
2.5.1 Gênero <i>Croton</i> L.	28
2.5.2 Espécie <i>Croton blanchetianus</i> Baill	29
3 JUSTIFICATIVA	32
4 OBJETIVOS	33
5 MATERIAL E MÉTODOS	34
5.1 PARASITOS E ANIMAIS	34
5.2 EXTRATO DE <i>Croton blanchetianus</i> Baill	34
5.3 ATIVIDADE ANTIPROMASTIGOTA	35
5.4 ATIVIDADE ANTIAMASTIGOTA	36
5.5 VIABILIDADE DOS MACRÓFAGOS	37
5.6 DOSAGEM DE NITRITO	37
5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA	37
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO	39

6.1 ATIVIDADE ANTIPROMASTIGOTA	39
6.2 ATIVIDADE ANTIAMASTIGOTA	43
6.3 CITOTOXICIDADE EM MACRÓFAGOS MURINOS	46
6.4 DOSAGEM DE NITRITO	47
6.5 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS OBSERVADAS EM PROMASTIGOTAS TRATADOS COM O EXTRATO DE <i>C. blanchetianus</i>	48
7 CONCLUSÕES	51
8 REFERÊNCIAS	52

LISTA DE ABREVIATURAS

ATP	Trifosfato de adenosina
B.O.D	Demanda Bioquímica de Oxigênio
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
IC ₅₀	Concentração necessária para inibir 50% das células
IFN- γ	Interferon gama
IL-10	Interleucina 10
IL-12	Interleucina 12
IL-13	Interleucina 13
IL-4	Interleucina 4
IL-5	Interleucina 5
iNOS	Enzima óxido nítrico sintase induzível
IS	Índice de Seletividade
LCD	Leishmaniose Cutânea Difusa
LCL	Leishmaniose Cutânea Localizada
LD ₅₀	Dose necessária para inibir 50% das células
LMC	Leishmaniose Mucocutânea
LTA	Leishmaniose Tegumentar Americana
LV	Leishmaniose Visceral
MDR1	Gene de resistência a múltiplas drogas
μm	Micrômetro
μM	Micromolar
Nm	Nanômetro
NO	Óxido Nítrico
OMS	Organização Mundial de Saúde
RENISUS	Relação de Plantas de Interesse ao SUS
ERRO	Espécies Reativas do Oxigênio
SFB	Soro Fetal Bovino
SFM	Sistema Fagocítico Mononuclear
SUS	Sistema Único de Saúde
T CD4+	Linfócitos T auxiliares que expressam a proteína de superfície CD4
Th1	Linfócitos T auxiliares do tipo 1
Th2	Linfócitos T auxiliares do tipo 2
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral alfa
$\alpha=0,05$	Nível de confiança de 95%

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Promastigotas e amastigotas de <i>Leishmania</i> sp.	7
Figura 2. Ciclo biológico da <i>Leishmania</i> sp.	8
Figura 3. Fêmea do flebotomíneo (Diptera: Psychodidae).realizando repasto sanguíneo	10
Figura 4. Manifestações clínicas da LTA e da LV.	13
Figura 5. Distribuição mundial da LTA, 2012.	14
Figura 6. Distribuição do número de casos de LTA no Brasil de 1989 a 2010.	14
Figura 7. Distribuição mundial da LV, 2012.	16
Figura 8. Distribuição da LV em Sergipe de 2003 a 2011.	18
Figura 09. Aspecto botânico de <i>Croton blanchetianus</i> Baill.	30
Figura 10. Atividade leishmanicida do extrato etanólico bruto de <i>C. blanchetianus</i> sobre promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> .	41
Figura 11. Viabilidade da forma amastigota de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> ao extrato etanólico bruto de <i>C. blanchetianus</i>	45
Figura 12. Índice de infecção de macrófagos murinos peritoneais	45
Figura 13. Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos murinos	48
Figura 14. Alterações morfológicas em promastigotas de <i>L. amazonensis</i> e <i>L. infantum</i> expostos ao extrato etanólico bruto de <i>C. blanchetianus</i>	49

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma parasitose de distribuição mundial que mata e debilita milhares de pessoas por ano. É considerada pela Organização Mundial de Saúde (OMS) uma das mais complexas doenças negligenciadas, pois apresenta grande diversidade clínica e epidemiológica.

Espécies do gênero *Leishmania* são os agentes etiológicos da leishmaniose, os quais são transmitidos ao ser humano e demais mamíferos por meio da picada de um inseto flebotomíneo infectado. As formas clínicas dessa parasitose são classificadas de acordo com o grau de metástase do parasito pelo organismo e com a gravidade das lesões geradas, manifestando-se da seguinte forma: leishmaniose cutânea, a forma mais comum da doença; mucocutânea, forma crônica que apresenta grande poder mutilante; cutânea difusa, complicação rara da leishmaniose cutânea; e visceral, forma mais perigosa e potencialmente letal, se não tratada.

Atualmente, todos os fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose são falhos, pois apresentam alta toxicidade, além de estarem envolvidos em relatos de resistência parasitária. Dessa forma, faz-se necessária a busca por terapias mais eficazes que contornem todos os pontos negativos apresentados pelos fármacos disponíveis.

Na busca por novos compostos bioativos contra esse protozoário, vários pesquisadores têm encontrado nos produtos naturais, derivados com propriedades leishmanicidas. As plantas, apontadas pela OMS como a maior e melhor fonte de medicamentos para a humanidade, servem de modelo para a síntese de novos compostos ou como substrato para obtenção de moléculas com atividade terapêutica.

Diversos compostos de plantas já foram testados contra promastigotas e amastigotas de *Leishmania* e alguns apresentaram atividade leishmanicida.

Plantas da família Euphorbiaceae são conhecidas popularmente pelo seu poder medicinal. O gênero *Croton*, o segundo maior dessa família, distribui grande parte de suas espécies pelo cerrado, caatinga e campos rupestres do Brasil. Diversas atividades terapêuticas comprovadas já foram associadas a esse

gênero. *Croton blanchetianus* Baill, popularmente conhecida como Marmeleiro, é uma planta comum na caatinga do estado de Sergipe e apresenta várias atividades biológicas, além de propriedades microbidas, fungicidas e larvicidas.

Dessa forma, o estudo da atividade dessa planta sobre parasitos do gênero *Leishmania* mostra-se de grande relevância, dada sua eficácia comprovada contra outros microrganismos em um cenário de falha terapêutica no tratamento da leishmaniose e necessidade urgente de novas terapias.

2 REVISÃO DE LITERATURA

As doenças tropicais negligenciadas são a causa de 534 mil mortes, por ano, nos países em desenvolvimento (KAPPAGODA; LOANNIDIS, 2014). Causadas por parasitos como protozoários, bactérias, vírus e fungos, essas doenças não despertam interesse em pesquisas e desenvolvimento tecnológico da indústria farmacêutica, pois acometem as pessoas mais pobres desses países. A leishmaniose é, atualmente, um grave problema de saúde pública, sendo considerada uma das seis doenças mais negligenciadas no mundo e a segunda doença de maior importância, causada por protozoários (BASTOS, 2006; WHO, 2010).

Naturalmente, a *Leishmania* é mantida em ecótopos silvestres entre os hospedeiros vertebrados e a população de vetores. Porém, quando o ser humano entra em contato com esses ecótopos, criando um desequilíbrio ambiental nas florestas, vetores e reservatórios são forçados a se adaptarem ao ambiente peridomiciliar ou domiciliar e o homem passa a ser mais um reservatório da doença, que assume a forma de antropozoonose (COSTA, 2005; DESJEUX, 2004).

A epidemiologia da leishmaniose é bastante diversa e pode ser modificada por alterações em qualquer posição do ciclo: vetor - reservatório - homem (REIS et al., 2013).

Atualmente, a leishmaniose é endêmica em 98 países com uma estimativa de 20 – 40 mil mortes causadas por essa doença e mais de 350 milhões de pessoas em risco de contrai-la (ALVAR et al., 2012).

No continente americano, a leishmaniose ocorre desde o sul dos Estados Unidos até o norte da Argentina. Aproximadamente 67 mil casos clínicos são registrados anualmente e cerca de 41 milhões de pessoas estão em risco de desenvolver a doença (REVEIZ et al., 2013).

No Brasil, mesmo sendo endêmica e considerada uma doença de notificação compulsória pelo Ministério da Saúde, a real prevalência da leishmaniose ainda não foi estabelecida. Isso ocorre devido ao sub-registro de

dados, inúmeros diagnósticos diferenciais existentes e infecções assintomáticas, entre outros (COSTA, 2005).

Os principais determinantes para que casos de leishmaniose sejam rapidamente distribuídos pelo país são: a pobreza, a ocupação desordenada das periferias, o processo de migração humana, a presença de reservatórios e vetores adaptados ao ambiente periurbano e urbano e a alta densidade populacional imunologicamente debilitada (ALVAR; YACTAYO; BERN, 2006; BARBOSA, 2013).

2.1 LEISHMANIAS

2.1.1 Taxonomia

Protozoários intracelulares do gênero *Leishmania* Ross, 1903 (Ordem: Kinetoplastida; Família: Trypanosomatidae) são os agentes etiológicos da leishmaniose, um complexo de doenças que acomete o ser humano e apresenta manifestações clínicas variadas, classificando-se inicialmente em leishmaniose tegumentar americana (LTA), na qual há lesões na pele, cartilagens e mucosas, e leishmaniose visceral, na qual o parasito exerce um elevado tropismo para órgãos do sistema retículoendotelial como fígado, baço e medula óssea. Esses parasitos são transmitidos aos hospedeiros vertebrados, inclusive o homem, por meio da picada de fêmeas de flebotomíneos infectadas (Ordem: Diptera; Família: Psychodidae) (READY, 2014).

Das espécies de *Leishmania* conhecidas até o momento, aproximadamente vinte são patogênicas ao homem e cerca de trinta espécies de flebotomíneos já foram incluídos no ciclo de transmissão por possuir atividade vetorial comprovada (CDC, 2014).

A classificação das espécies desse gênero ainda não é um tema consensual entre a comunidade científica. De forma geral, elas são classificadas, primariamente, pelas manifestações clínicas que causam e por sua distribuição geográfica, bem como por outros critérios como comportamento do parasito no vetor e nos reservatórios e por suas características bioquímicas e moleculares (LOPES et al., 2010).

De acordo com uma das classificações mais aceitas, proposta por Lainson et al. (1987), o gênero *Leishmania* se divide em dois subgêneros: o *Leishmania* e o *Viannia*, sendo o desenvolvimento do parasito no trato gastrointestinal do inseto vetor, o critério de classificação utilizado. No subgênero *Leishmania* o parasito se desenvolve nos intestinos anterior e médio do flebotomíneo, já no subgênero *Viannia*, o parasito se desenvolve nos intestinos anterior, médio e posterior.

Segundo essa classificação, as espécies do gênero *Leishmania* encontradas no novo mundo são distribuídas nos dois subgêneros de acordo com a Tabela 1.

Tabela 1. Classificação das espécies neotropicais do gênero *Leishmania*.

Gênero <i>Leishmania</i> Ross, 1903	
Subgênero <i>Leishmania</i>	Subgênero <i>Viannia</i>
<i>L.(L.) infantum</i>	<i>L. (V.) braziliensis</i>
<i>L. (L.) enriettii</i>	<i>L. (V.) peruviana</i>
<i>L. (L.) mexicana</i>	<i>L. (V.) guyanensis</i>
<i>L. (L.) amazonensis</i>	<i>L. (V.) panamensis</i>
<i>L. (L.) aristidesi</i>	<i>L. (V.) shawi</i>
<i>L.(L.) venezuelensis</i>	<i>L. (V.) naiffi</i>
<i>L. (L.) garnhami</i>	<i>L. (V.) colombiensis</i>
<i>L.(L.) pifanoi</i>	<i>L. (V.) equatorensis</i>
<i>L.(L.) hertigi</i>	<i>L. (V.) Lindenbergl</i>
<i>L.(L.) deanei</i>	<i>L. (V.) utingensis</i>
<i>L. (L.) forattinii</i>	<i>L. (V.) lainsoni</i>

Fonte: Lainson (2010).

Embora a espécie *L. (L.) donovani* pertença ao subgênero *Leishmania*, não foi incluída na classificação acima por se tratar de uma espécie causadora de leishmaniose visceral apenas nos países do velho mundo. Em uma classificação

mais antiga, proposta por Lainson e Shaw (1979) as leishmanias causadoras da forma visceral estavam agrupadas em um complexo chamado *Leishmania donovani*, no qual estavam inseridas as espécies *L. donovani*, *L. infantum* e *L. chagasi*. Em um trabalho realizado por Maurício, Stothard e Miles (2000) foi exposto que as espécies *L. infantum* e *L. chagasi* são indistinguíveis geneticamente, sendo um grupo monofilético e serão, portanto, tratadas como sinônimas neste trabalho.

2.1.2 Ciclo biológico

O gênero *Leishmania* se caracteriza por possuir um ciclo heteroxênico, no qual há hospedeiros vertebrados e invertebrados - insetos do gênero *Phlebotomus* (vetores nos países do velho mundo) e *Lutzomyia* (vetores nos países do novo mundo) (NEVES, 2010).

Durante seu ciclo de vida, a *Leishmania*, alterna-se entre duas principais formas morfológicas: amastigota e promastigota (Figura 1). A forma amastigota possui um corpo arredondado (2-4 μm de diâmetro) e sem flagelo livre e é intracelular obrigatória de células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM) do hospedeiro mamífero. A forma promastigota é encontrada no meio extracelular do trato gastrointestinal do flebotomíneo e consiste em um corpo alongado (aproximadamente 15-20 μm de comprimento por 1,5-3,5 μm de largura) com um flagelo livre (aproximadamente 15-28 μm de comprimento). No final do desenvolvimento no vetor, os promastigotas passam por um processo chamado de metaciclogênese, no qual eles param de se reproduzir e se tornam mamífero-infectantes. Esta forma é chamada de promastigota metacíclica e é altamente adaptada à transmissão e sobrevivência no início da infecção do hospedeiro vertebrado (HERWALDT, 1999; GOSSAGE, ROGERS; BATES, 2003).

Ao realizar o repasto sanguíneo, a fêmea do flebotomíneo infectada introduz na pele do mamífero formas promastigotas metacíclicas, juntamente com sua saliva que tem função vasodilatadora, anticoagulante e quimiotática para macrófagos (COLLIN et al., 2009). No hospedeiro vertebrado, os promastigotas são fagocitados por células mononucleares, principalmente macrófagos, nos

quais ficarão restritos ao fagolisossomo (junção do fagossomo com lisossomos), cujo ambiente interno é ácido e rico em enzimas hidrolíticas e peptídeos microbicidas (HANDMAN; BULLEN, 2002). Dentro do fagolisossomo os promastigotas, que são sensíveis a esse ambiente ácido, transformam-se em amastigotas que desenvolvem mecanismos para subverter a atividade microbicida do macrófago. Após a transformação, eles se multiplicam por divisão binária até que o macrófago se rompa, liberando novos amastigotas que poderão infectar células dendríticas, fibroblastos ou outros macrófagos, permanecendo nessa fase enquanto durar o ciclo no mamífero. Dando continuidade ao ciclo, o flebotomíneo se infecta com o parasito ao ingerir células dendríticas ou macrófagos infectados por amastigotas, os quais se transformarão em promastigotas em seu trato gastrointestinal e se multiplicarão por divisão binária até atingirem o estágio de promastigotas metacíclicas, quando o inseto poderá inoculá-las em um novo hospedeiro mamífero (HANDMAN; BULLEN, 2002; SHARMA; SINGH, 2008) (Figura 2). Apesar dessa ser a forma clássica de transmissão da leishmaniose, a infecção também pode ocorrer por transfusão sanguínea, transplante de órgãos ou congenitamente (PAVLI; MALTEZOU, 2010).

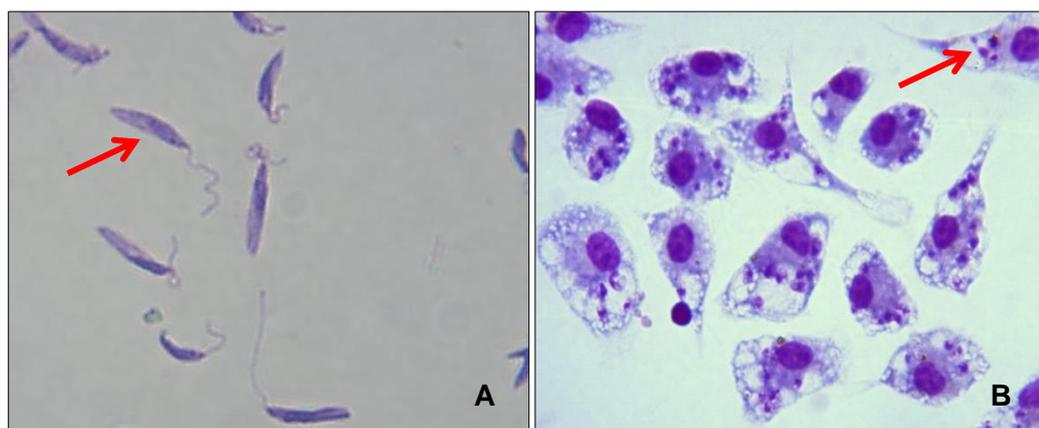


Figura 1. *Leishmania* sp. (A) Promastigotas; (B) Amastigotas (nos fagolisossomos dos macrófagos). Aumento de 1000x.

Fonte: Arquivo pessoal

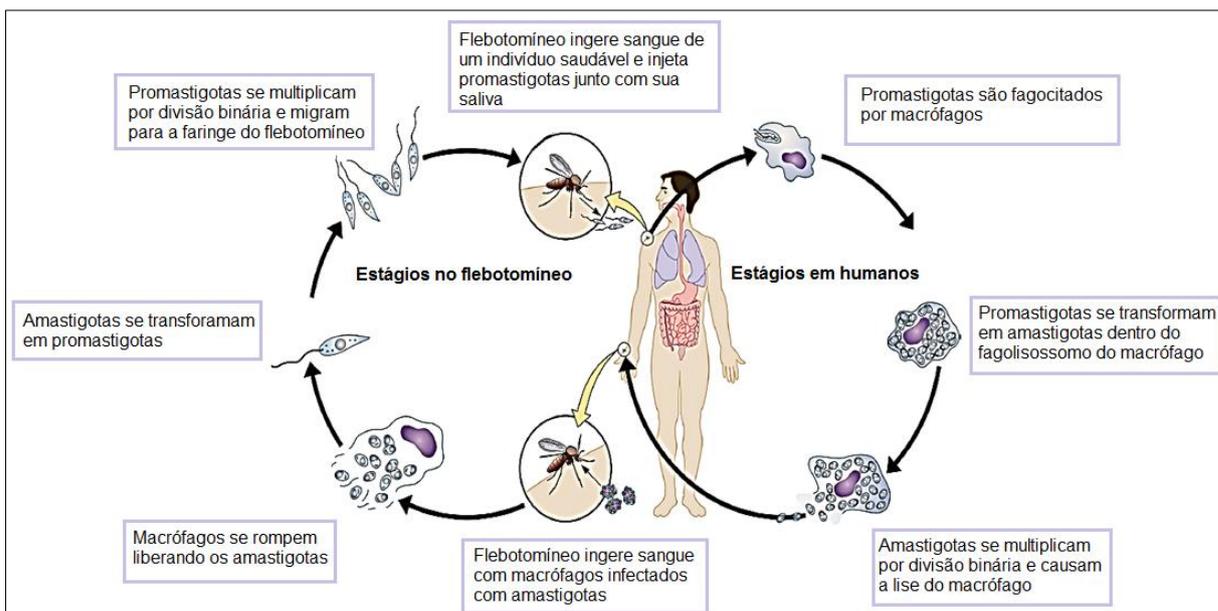


Figura 2. Ciclo biológico da *Leishmania* sp.

Fonte: Modificado de Esch e Petersen (2013)

Para sobreviver nos ambientes hostis enfrentados durante seu ciclo de vida, a *Leishmania* desenvolve eficientes mecanismos de escape tanto no inseto vetor, quanto no hospedeiro mamífero. No vetor, a *Leishmania* sobrevive ao ataque proteolítico no intestino; previne sua excreção inibindo o peristaltismo; evita a concorrência da microbiota intestinal e migra para o intestino anterior do inseto antes da realização do repasto sanguíneo (READY, 2013). No ser humano, o parasito evita o ataque do sistema imune inato enquanto estiver na corrente sanguínea e tecidos, media a endocitose pelo macrófago, inibe a fusão do fagossomo com o lisossomo enquanto ainda é promastigota, esquiva-se da degradação por enzimas hidrolíticas e metabolitos tóxicos no fagolisossomo e evita que o macrófago seja ativado para destruí-lo, inibindo a sinalização celular e a produção de algumas citocinas (CUNNINGHAN, 2002).

2.1.3 Reservatórios e vetores

A interação parasito-reservatório é considerada um sistema complexo por ser multifatorial, imprevisível e dinâmica, além de formar uma unidade biológica que pode estar em constante mudança. Dessa forma, os animais chamados de reservatórios são aqueles que permitem a manutenção da *Leishmania* na natureza, bem como sua circulação. Primariamente, os animais envolvidos no ciclo de transmissão da leishmaniose são mamíferos silvestres como canídeos e roedores; porém, com a crescente domiciliação do ciclo, animais sinantrópicos e domésticos têm assumido papel de reservatórios do parasito (DANTAS-TORRES, 2007; BRASIL, 2009).

Infecções por leishmanias que causam a forma tegumentar da doença (LTA) já foram verificadas em animais silvestres, sinantrópicos e domésticos (canídeos, felídeos e equídeos). Contudo, o papel dos animais domésticos como reservatório, ainda não está esclarecido. Dessa forma, acredita-se que animais silvestres sejam os reservatórios naturais, já que o ciclo da LTA é basicamente rural. Roedores, marsupiais e canídeos silvestres foram descritos como hospedeiros e possíveis reservatórios do parasito (GRAMICCIA; GRADONI, 2005; BRASIL, 2009).

O cão doméstico (*Canis familiaris*) tem sido identificado como o principal reservatório de *L. infantum* na área urbana, sendo a principal fonte de infecção para leishmaniose visceral (LV). Isso acontece devido à estreita relação que tem com o ser humano, pela susceptibilidade à infecção que apresenta e, além disso, pelo fato de poder permanecer infectado por toda a vida sem apresentar sinais clínicos da doença. A infecção canina configura-se como anterior à humana e é mais prevalente. No ambiente silvestre, os reservatórios descritos do parasito são as raposas e os marsupiais (DANTAS-TORRES, 2007; BRASIL, 2009).

Os flebotomíneos são os únicos vetores naturais das espécies de *Leishmania* (READY, 2013). São insetos pequenos (1-5 mm) que apresentam o corpo e pernas densamente pilosos e quando pousam mantêm as asas entreabertas e levantadas sobre o dorso (Figura 3). São popularmente conhecidos nas diferentes regiões do Brasil como mosquito-palha, tatuquira, birigui, cangalhinha, asa dura, entre outros. Somente as fêmeas realizam a hematofagia e o horário propício se inicia, de forma geral, próximo ao crepúsculo vespertino e acaba antes do crepúsculo matutino (LINDHOLZ, 2012).

De habitat naturalmente silvestre, esses insetos têm se adaptado a novos ambientes, gerando um maior risco de transmissão das leishmanioses em zonas urbanas e periurbanas, mostrando que modificações no meio ambiente, causadas pelo homem, influenciam na composição e comportamento da fauna flebotomínica (BARBOSA et al., 2008).



Figura 3. Fêmea do flebotomíneo (Diptera: Psychodidae) realizando repasto sanguíneo.

Fonte: <http://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/index.html>

Segundo Killick - Kendrick (1990) há alguns critérios para atribuir a uma espécie de flebotomíneo competência vetorial para transmissão da leishmaniose, são eles: antropofilia, distribuição espacial concordante com os casos de leishmaniose humana, infecção natural por espécies de *Leishmania* que infecta o homem, atração por mamíferos reservatórios da *Leishmania* e capacidade de se infectar e transmitir o parasito através da picada.

Pertencentes à família Psychodidae, somente os gêneros *Phlebotomus* e *Lutzomyia* estão associados ao ciclo da leishmaniose, sendo o primeiro responsável pela transmissão da doença nos países do velho mundo e o segundo, nos países do novo mundo (LINDHOLZ, 2012).

No Brasil, são as espécies do gênero *Lutzomyia* que transmitem o parasito ao ser humano. Com ampla distribuição geográfica, as principais espécies envolvidas na transmissão da LTA, são: *Lu. whitmani*, *Lu. intermedia*, *Lu.*

umbratilis, *Lu. wellcomei*, *Lu. flaviscutellata*, e *Lu. migonei*. Já as envolvidas na LV, são: *Lu. longipalpis* e *Lu. cruzi*, sendo que a primeira é considerada a principal espécie envolvida na transmissão da *Leishmania infantum* (BRASIL, 2009).

2.2 LEISHMANIOSES

A leishmaniose é uma das mais complexas doenças transmitidas por vetores. Isto ocorre devido à complexidade epidemiológica e ecológica da infecção, causada pela variedade de espécies do parasito, bem como do inseto vetor (SHARMA; SINGH, 2008).

A classificação dessa doença é feita de acordo com os diferentes graus de metástase do parasito no organismo do hospedeiro, bem como a gravidade das lesões geradas, sendo inicialmente dividida em leishmaniose tegumentar americana (LTA) e leishmaniose visceral (LV) (WHEELER; GLUENZ; GULL, 2011) (Figura 4).

2.2.1 LTA e sua epidemiologia

A leishmaniose tegumentar americana é uma zoonose causada por diversas espécies de *Leishmania* que acomete primariamente animais silvestres e domésticos e secundariamente o homem. É uma doença dermatológica infecciosa, mas não contagiosa, que exige maior atenção devido ao risco de deformidades e estigma social que pode causar no indivíduo (CELLA et al., 2012). De acordo com Desjeux (2004) ela pode se manifestar clinicamente como:

- LCL (Leishmaniose Cutânea Localizada): é a forma mais frequente da LTA e tem tendência para a cura espontânea. Os parasitos permanecem no local da infecção, causando limitadas lesões que podem ser simples ou múltiplas e que geralmente ocorrem no local da picada do flebotomíneo. Inicialmente é formada uma mácula que depois evolui para pápula, nódulo e úlcera com bordas elevadas e fundo granuloso (Figura 4A). É geralmente indolor, se não houver infecção secundária bacteriana e, na maioria das vezes, cicatriza espontaneamente após

algumas semanas. O indivíduo pode desenvolver a doença depois de semanas, meses ou até anos após o contato inicial com o parasito, ou ainda apresentar uma infecção assintomática. Em casos de auto cura, uma proteção contra a doença pode ser desencadeada ao longo da vida, podendo ou não ser restrita a mesma espécie de *Leishmania* envolvida na infecção (REITHINGER et al, 2007). A LCL pode ser causada por todas as espécies dermatrópicas de *Leishmania*. No Brasil, as espécies de maior importância epidemiológica são *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* (BRASIL, 2010b);

- LMC (Leishmaniose Mucocutânea): é uma infecção crônica que apresenta graves lesões mucocutâneas mutilantes. Desenvolve-se a partir de uma infecção cutânea, na qual o parasito se dissemina para as mucosas por via linfática ou hematogênica. Apesar da escassez de parasitos, há uma exacerbação da resposta imune do hospedeiro, a qual promove intensa lesão tecidual nas mucosas do nariz, boca, faringe e tecidos próximos (Figura 4B). A LMC nunca cicatriza espontaneamente e é difícil de tratar, pois é comum haver infecção secundária bacteriana. As recidivas são frequentes e é uma doença potencialmente fatal. O principal agente etiológico causador da LMC é a *L. (V.) braziliensis* (LOPES et al., 2010; REITHINGER et al., 2007).

- LCD (Leishmaniose Cutânea Difusa): é uma complicação rara da LTA. Causa lesões cutâneas crônicas não ulcerosas e multiparasitárias com formação de pápulas, nódulos ou infiltrações difusas e que pode se disseminar por via hematogênica para todo o corpo devido à intensa proliferação dos parasitos (Figura 4C). Geralmente ocorre em indivíduos anérgicos, ou seja, incapazes de montar uma resposta imune efetiva. Na maioria das vezes, as lesões não involuem espontaneamente e mesmo diminuindo com o uso de quimioterápicos adequados é alto o risco de recidiva após o tratamento. No Brasil, a espécie envolvida nessa forma de LTA é a *L. (L.) amazonensis* (COSTA, 2013; BRASIL, 2010b);

São registrados por ano, em todo o mundo, 0,7 – 1,2 milhão de casos de leishmaniose cutânea (Figura 5). O Brasil está entre os sete países com as maiores taxas de leishmaniose cutânea do mundo e é o país da América do Sul que concentra a maior parte dos casos (ALVAR et al., 2012).

Inicialmente, os casos se concentravam nas áreas rurais; porém, devido à extensão das atividades no campo e o desequilíbrio ambiental, a doença se espalhou, inclusive para centros urbanos, tornando-se uma doença periurbana. Em 1985, foram introduzidas no país medidas de vigilância e controle para a leishmaniose cutânea, o que permitiu que houvesse um aumento na tendência do número de casos registrados, mostrando que picos de transmissão ocorrem a cada cinco anos (Figura 6). Em 2003, todos os estados do país passaram a apresentar casos autóctones da LTA, porém a prevalência é maior nos estados do norte e nordeste, concentrando 70% dos casos (ALVAR et al., 2012; CARVALHO, 2012).

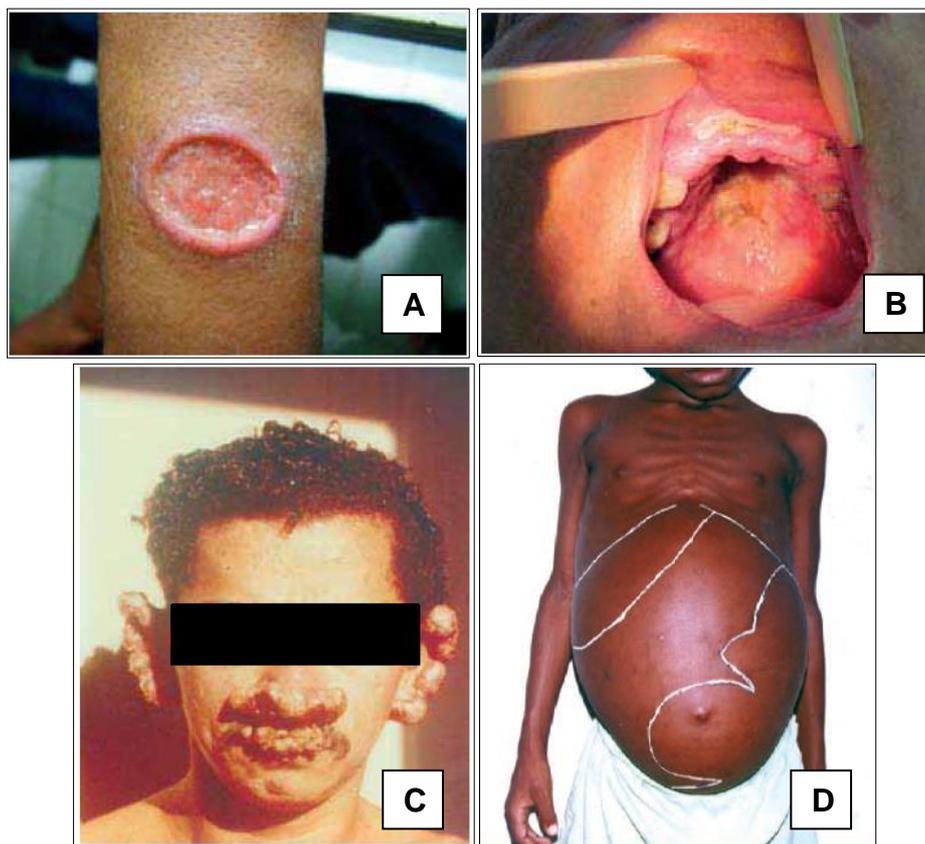


Figura 4. Manifestações clínicas da leishmaniose tegumentar e da leishmaniose visceral. A: LCL (leishmaniose cutânea localizada); B: LMC (leishmaniose mucocutânea); C: LCD (leishmaniose cutânea difusa); D: LV (leishmaniose visceral).

Fonte: A,B e C (BRASIL, 2010b); D (BRASIL, 2013)

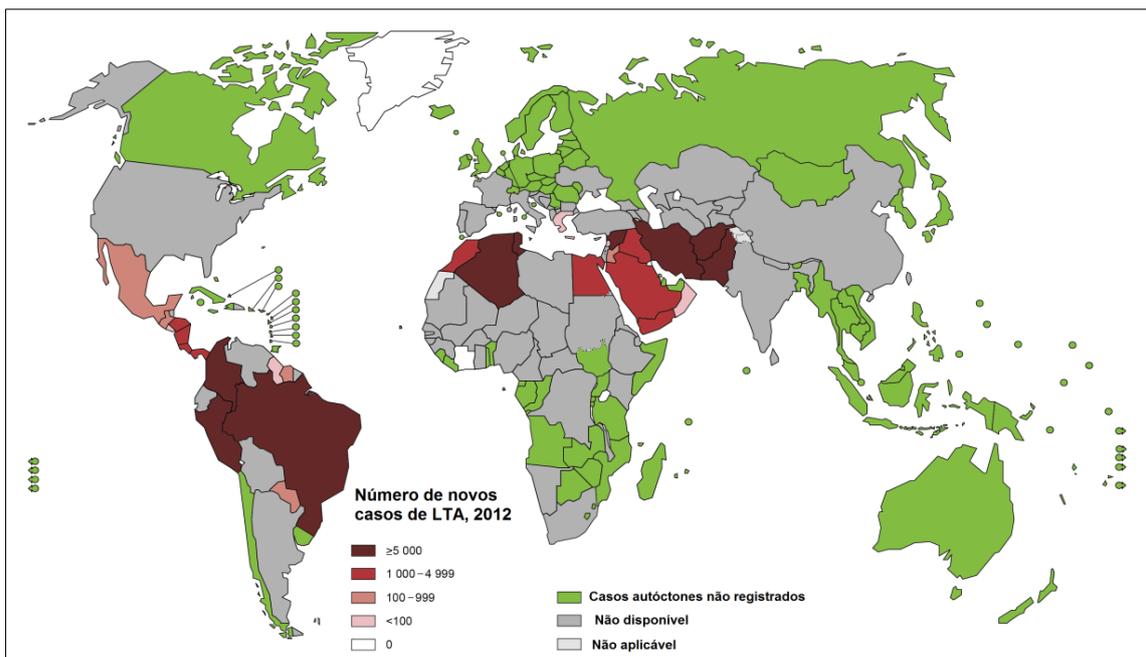


Figura 5. Distribuição mundial da Leishmaniose Tegumentar Americana, 2012.

Fonte: WHO (2014a)

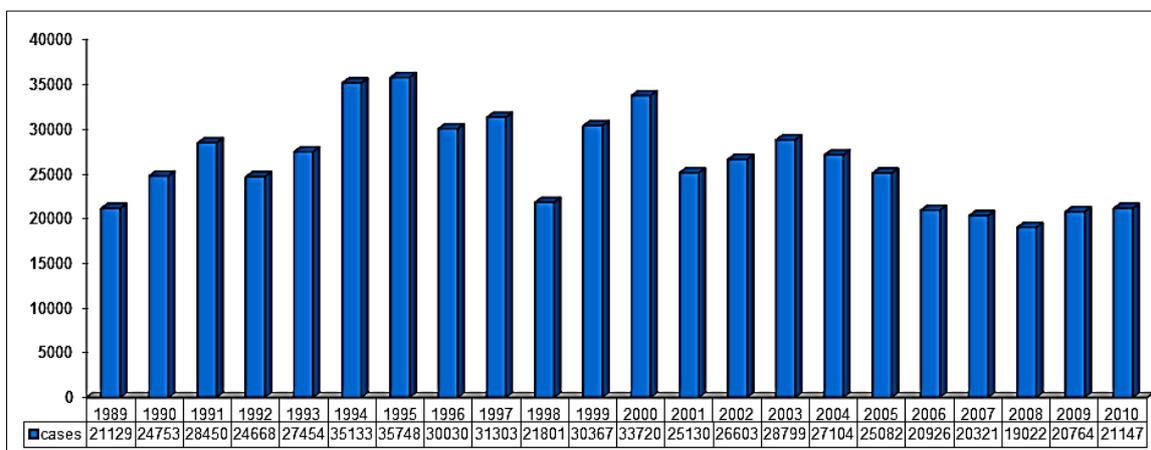


Figura 6. Distribuição do número de casos de Leishmaniose Tegumentar Americana no Brasil. Período de 1989 a 2010.

Fonte: Alvar et al. (2012)

No período de 1990 a 2009 ocorreram 550.250 casos de LTA no Brasil, distribuídos pelas regiões do país da seguinte forma: 36,2% dos casos na região norte; 34,8% na região nordeste; 15,2% na região centro-oeste; 10,3% na região sudeste e 2,3% dos casos na região sul (PIOVESAN, 2012).

Na região Nordeste, no período de 2001 a 2010, os estados que apresentaram maior coeficiente de detecção para a LTA foram: Maranhão, Ceará e Bahia. De acordo com a categorização dos índices de incidência, proposta pelo Ministério da Saúde (BRASIL, 2010b), o estado de Sergipe apresentou coeficiente médio (de 3 a 11 casos/ 100 mil habitantes) nos anos de 2001 e 2002 e coeficiente baixo (menos de 3 casos/ 100 mil habitantes) nos anos de 2003 a 2010 (Tabela 2) (RIBEIRO, 2013).

Tabela 2. Coeficiente de detecção dos casos de Leishmaniose Tegumentar Americana por 100 mil habitantes. Região Nordeste. 2001-2010.

UF	2001	2002	2003	2004	2005	2006	2007	2008	2009	2010
Alagoas	3,1	2,8	3,3	2,2	1,9	1,1	3,6	2,8	2,4	1,0
Bahia	15,3	14,7	15,0	12,8	14,5	16,7	13,6	20,8	23,5	33,3
Ceará	33,7	27,7	17,1	26,3	24,4	12,2	11,2	8,3	11,6	12,0
Maranhão	98,7	75,2	64,3	51,7	55,6	35,2	37,3	26,3	25,5	37,3
Paraíba	1,4	1,9	1,6	2,1	1,9	1,3	1,6	1,4	2,9	2,2
Pernambuco	6,5	6,9	6,8	8,7	4,0	4,9	5,2	4,4	5,7	4,8
Piauí	5,7	5,2	4,3	4,0	8,5	5,0	3,5	2,3	3,3	4,7
Rio Grande do Norte	0,3	0,2	0,3	0,4	0,3	0,2	0,2	0,2	1,8	2,6
Sergipe	5,1	3,3	0,9	0,4	0,6	0,3	0,2	0,5	0,5	0,3

Modificado de Ribeiro, 2013.

Segundo a última publicação do Relatório de Situação do Estado de Sergipe (BRASIL, 2011), em 2009 ocorreram 11 casos de LTA no estado, registrados em nove municípios. O sexo masculino representou 45,5% dos casos e 90,9% eram indivíduos maiores de 10 anos.

2.2.2 LV e sua epidemiologia

A forma mais perigosa da leishmaniose é a visceral, com evolução para óbito em 90% dos casos não tratados. No Brasil, o agente etiológico da LV é a espécie *L. (L.) chagasi* que causa uma doença crônica, na qual os parasitos exercem elevado tropismo pelo sistema linfático ou vascular até infectar outras

células do Sistema Fagocítico Mononuclear (SFM), resultando em uma forma sistêmica com infiltração da medula óssea, hepatoesplenomegalia e linfadenopatia (Figura 4D). Após um período de incubação de aproximadamente 2-6 meses, o indivíduo infectado pode apresentar febre, geralmente associada com calafrios, fadiga e fraqueza que ocorrem em decorrência da anemia e estado inflamatório persistente, perda de apetite e perda de peso (BRASIL, 2010a). Vale ressaltar que nem sempre o paciente irá apresentar os sinais clínicos da doença, pois esta infecção pode permanecer assintomática ou apresentar sintomas que são facilmente confundidos com os de outras patologias. As manifestações clínicas da LV refletem o desequilíbrio entre o sistema imune do indivíduo, o processo inflamatório gerado e a multiplicação dos parasitos no SFM (CHAPPUIS et al., 2007).

São registrados por ano, em todo o mundo 200-400 mil novos casos de leishmaniose visceral (Figura 7) e o Brasil é um dos cinco países que concentram 90% dos casos da doença (ALVAR et al., 2012; PAES-GONÇALVES et al., 2012).

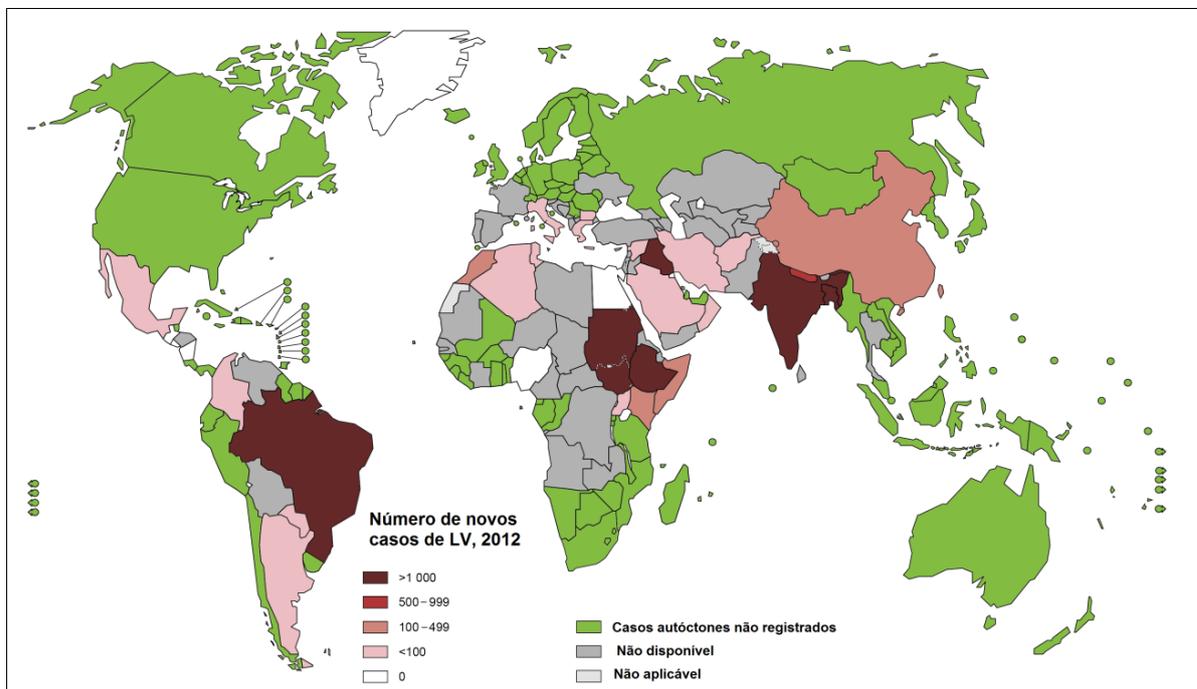


Figura 7. Distribuição mundial da Leishmaniose Visceral, 2012.

Fonte: WHO (2014b)

A leishmaniose visceral é considerada um grave problema de saúde pública no país, devido a sua escala e extensão geográfica. Inicialmente, os casos eram focais e ocorriam em zona rural, principalmente na região Nordeste. Porém, desde 1980, a distribuição geográfica da LV tem se expandido para áreas não endêmicas, seguindo um padrão de urbanização (DANTAS-TORRES; BRANDÃO-FILHO, 2006). Fatores de risco como desmatamento desenfreado, condições precárias de moradia, migração da população da zona rural para áreas urbanas e um número crescente de cães infectados, têm envolvimento nesse padrão de distribuição (WERNECK et., 2002). Atualmente, são encontrados casos de LV em todas as regiões do país, em 21 estados, com uma incidência de 3.500 casos registrados anualmente (MARTINS-MELO et al., 2014).

As regiões do Brasil onde há casos de transmissão de LV são classificadas de acordo com o risco epidemiológico em: transmissão esporádica ($< 2,4$ casos), transmissão moderada ($\geq 2,4$ e $< 4,4$ casos) e transmissão intensa ($\geq 4,4$ casos). O indicador é a média de casos dos últimos cinco anos (BRASIL, 2013).

No período de 1998 a 2010 foram registrados 32.459 casos de LV nos 21 estados com casos autóctones. A média anual foi de 3.246 casos, com uma taxa de incidência de 1,85 por 100 mil habitantes e uma tendência ao aumento do número de casos (ALVAR et al., 2012). Entre 2000 e 2011, a média do número de mortes relacionadas à LV foi de 277 por ano, variando de 198 em 2001 para 350 em 2009, com 63,4% das mortes do sexo masculino e 37% menores de 15 anos (MARTINS-MELO et al., 2014).

A região Nordeste, na década de 1990, era responsável por cerca de 90% dos casos de LV registrados no país. Atualmente, representa 48% dos casos, mas continua sendo a principal região endêmica do Brasil. No período de 2000 a 2011, 56% das mortes por LV no país ocorreram na região Nordeste, a qual apresenta taxas de morte e risco de mortalidade cerca de duas vezes a média nacional. O elevado número de casos e mortes nesta região reflete a vulnerabilidade social e ambiental que favorece a propagação da doença (MARTINS-MELO et al., 2014).

O primeiro caso de LV no Brasil foi descrito por Evandro Chagas em 1934, em um jovem de 16 anos natural do estado de Sergipe. Do período de 1972 a 1998 foram diagnosticados 1.874 casos de LV nesse estado, distribuídos em 67 dos 75 municípios existentes. A média da incidência aumentou de 1,96 na década

de 1970, para 7,60 na década de 1990, ocorrendo aumento progressivo do número de casos de LV em todas as regiões do estado (TAVARES; TAVARES, 1999).

Entre 1999 e 2008, foram registrados 192 casos autóctones de LV em Sergipe, com um coeficiente de incidência anual variando de 1,1 a 9,0 casos por 100 mil habitantes. A média anual de 19,2 casos, nesse período, classifica o estado como zona de transmissão intensa (GOES; MELO; JERALDO, 2012). No período de 2003 a 2011, a incidência média aumentou de 1,0 para 3,3, sendo a região leste do estado a mais afetada (Figura 8) (SANTOS, 2013).

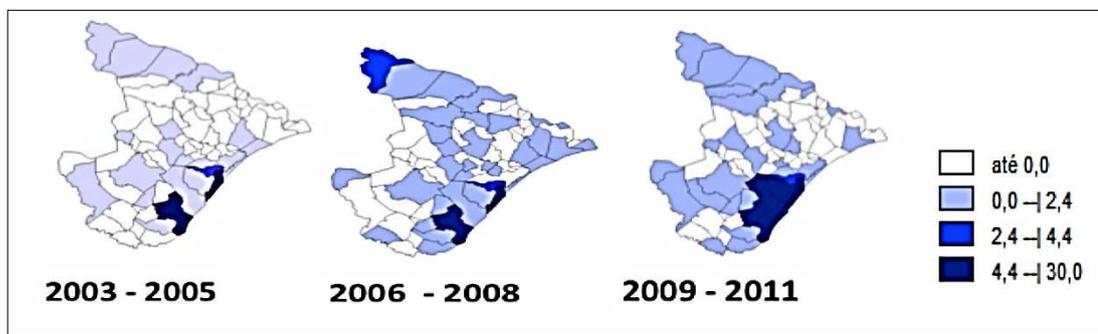


Figura 8 Distribuição da Leishmaniose Visceral em Sergipe. Período 2003 a 2011.

Fonte: Santos (2013)

Em um estudo epidemiológico descritivo realizado por Goes e Jeraldo (2013), no Hospital de Urgência de Sergipe, hospital referência para diagnóstico e tratamento da LV, constatou-se que foram registrados no período de 2007 a 2011, 164 casos autóctones de LV; destes, 71,5% foram do sexo masculino e 31,2% ocorreram em crianças de 1- 4 anos.

Tendo em vista a alta incidência de casos de LV no país, o Programa Nacional de Controle da Leishmaniose Visceral do Brasil recomenda que medidas de controle como o diagnóstico precoce e tratamento dos casos humanos, inquérito sorológico canino e eutanásia dos cães soropositivos, pulverização sistemática em área domiciliar e peridomiciliar e ações de educação em saúde junto à população, devem ser tomadas em conjunto para reduzir esta incidência (BRASIL, 2013).

2.2.3 Resposta imune

Na LTA, não só fatores do parasito são responsáveis pela patogênese da doença e suas manifestações clínicas. Características intrínsecas do vetor e constituição genética e imunológica do hospedeiro também são imprescindíveis para o estabelecimento ou não da doença (REIS et al., 2006).

A resposta imune desenvolvida contra a *Leishmania* pode determinar a cura, através do controle e eliminação do parasito, ou o desenvolvimento da infecção, por meio de uma resposta imune ineficiente, errada ou exacerbada. Baseado na infecção de modelos murinos, sabe-se que os linfócitos do tipo T CD4+ influenciam diretamente o resultado da doença. Esses linfócitos se dividem em pelo menos duas subpopulações: Th1 e Th2. Após o contato com o parasito, uma comunicação celular é estabelecida. Citocinas pró-inflamatórias como IL-12, produzidas por macrófagos e células dendríticas, e INF- γ (Interferon gama), produzido por células Natural Killer e linfócitos T ativados, promovem o desenvolvimento de uma resposta Th1, importante na resistência à leishmaniose, pois agem ativando o macrófago para que este destrua o patógeno. Além do INF- γ , o linfócito T ativado também produz TNF- α (fator de necrose tumoral - alfa), ambos eficientes contra microrganismos intracelulares. Já a produção de citocinas inibitórias de macrófagos como IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13, induz a uma resposta do tipo Th2, com perfil de susceptibilidade à doença (ANTONELLI et al., 2004).

Em todas as formas clínicas da LTA, a resistência ao parasito está relacionada a uma resposta imune celular Th1 e a susceptibilidade, a uma resposta imune Th2. Por se tratar de um parasito intracelular, a resposta Th1 deve ativar células específicas a produzirem citocinas protetoras que ativarão os macrófagos infectados a liberarem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, culminando com a morte do parasito (ANTONELLI et al., 2004).

Na LCL geralmente há uma resposta celular eficiente contra o parasito, com produção de citocinas Tipo 1 (INF- γ , TNF- α , IL-12), as quais ativam o macrófago a controlar a infecção (VIEIRA et al., 2002). Nos pacientes anérgicos ou com alguma imunodeficiência, como no caso da AIDS, a incapacidade de montar uma resposta celular efetiva está envolvida com a evolução da doença e menor resposta a terapêutica. Nesse caso, a LCL pode evoluir para a forma LCD que se caracteriza por uma falha na resposta Th1 e estabelecimento de uma

resposta imune Th2, com perfil de citocinas do Tipo 2 (IL-10, IL-4), as quais modulam a resposta imune, inibindo a ativação do macrófago o que desencadeia a multiplicação descontrolada do parasito, aumento das lesões geradas e sua disseminação pelo corpo (BOMFIM et al., 1996). Já na LMC há uma exacerbação da resposta imune dos tipos Th1 e Th2, com predominância da resposta Th1 e produção exagerada de citocinas do Tipo 1, o que acarreta a imunopatogênese exacerbada dessa doença (AMATO; ANDRADE JÚNIOR; DUARTE, 2003).

Na LV, muitas pessoas desenvolvem uma resposta imune efetiva contra o parasito, não desencadeando a doença. Existem vários fatores que determinarão se haverá ou não a patologia, se ela permanecerá assintomática ou será sintomática, ou ainda, se a infecção será cutânea ou visceral. O fator mais importante para determinar a patogenicidade, virulência e manifestações clínicas é a espécie da *Leishmania* envolvida na infecção (MCCALL; ZHANG; MATLASHEWSKI, 2013). Em relação ao indivíduo, os fatores determinantes mais comuns são: padrão genético envolvido no tipo de resposta imune (BLACKWELL et al., 2009), coinfeção com o vírus HIV (RABELLO; ORSINI; DISCH, 2003), estado nutricional e faixa etária (DYE; WILLIAMS, 1993). O inseto vetor também aparece como determinante no desenvolvimento da doença. Sabendo que *Leishmania chagasi* transmitida por *Lutzomyia longipalpis* pode causar a forma cutânea ou visceral, estudos relatam o envolvimento da saliva do flebotomíneo (ROHOUSOVÁ et al, 2012) e a carga parasitária inoculada no repasto sanguíneo (MAIA et al., 2011) como sendo fatores determinantes para ocasionar a LV.

Em relação ao perfil da resposta imune desenvolvida pelo ser humano na LV, sabe-se que o estabelecimento da doença está ligado a uma falha na resposta imune celular Th1 e desenvolvimento de uma resposta Th2 com produção da citocina IL-10, principal citocina imunossupressora na forma visceral, que age inibindo o macrófago (KARP et al., 1993).

2.3 TRATAMENTO

O tratamento de indivíduos infectados faz parte da política de controle das leishmanioses (SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004). Um agente

leishmanicida deve ser eficaz, seguro, de fácil administração e acessível para a população; contudo, na prática, tal agente ainda não está disponível. A falta de interesse das indústrias farmacêuticas pelas doenças negligenciadas faz com que estas sejam tratadas com medicamentos que apresentam alta toxicidade (MICHELETTI; BEATRIZ, 2012). A escolha do tratamento, portanto, é baseada em experiências anteriores, bem como pela disponibilidade do medicamento no país. Para que o tratamento seja realizado, os pacientes devem ser encaminhados para hospitais especializados e a terapia deve ser iniciada tão logo apareçam os sintomas (PAVLI; MALTEZOU, 2010).

2.3.1 Antimoniais pentavalentes

Os fármacos de primeira escolha recomendados e utilizados no tratamento das leishmanioses visceral e tegumentar são os antimoniais pentavalentes (Sb^V). Desenvolvidos há mais de 70 anos, apresentam alta toxicidade e estão associados a vários casos de resistência do parasito (CROFT; SEIFERT; YARDLEY, 2006).

O primeiro antimonial a ser usado contra a leishmaniose foi o tártaro emético (antimônio trivalente – Sb^{III}), desenvolvido pelo médico brasileiro Gaspar Vianna em 1912. Algum sucesso foi obtido no tratamento das leishmanioses, mas efeitos tóxicos e colaterais o fizeram ser substituído, em 1937, pelo antimonial pentavalente, estibugluconato de sódio (Pentostan®), derivado do ácido estibônico. Com isso, houve redução nos efeitos tóxicos e colaterais, quando comparado ao tártaro emético. Durante a segunda guerra mundial, surgiu na França um fármaco alternativo, o antimoniato de N-metil glucamina ou antimoniato de meglumina, comercializado como Glucantime®. Enquanto o Pentostan® é comercializado nos países de língua inglesa, o Glucantime® é o fármaco utilizado no Brasil e em países de língua francesa e espanhola (SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004).

O efeito do antimonial pentavalente frente ao tratamento da leishmaniose já foi comprovado; porém, o mecanismo de ação desta fórmula no combate à *Leishmania* ainda é pouco compreendido. Uma hipótese é que o Sb^V seria uma

pró-droga, que no organismo do ser humano seria reduzido por tióis à forma ativa Sb^{III} que é mais potente e tóxica contra as leishmanias (FRÉZARD et al., 2001). Segundo Amato (2006), o antimônio pentavalente atua no mecanismo bioenergético da forma amastigota, interferindo na glicólise e β -oxidação de ácidos graxos, causando uma depleção de ATP intracelular. Além disso, outra proposta diz que o antimônio pentavalente inibe enzimas do metabolismo do parasito como a Superóxido Desmutase (RAYCHAUDHURY et al., 2005) e a Topoisomerase, causando sua morte (DEMICHELI et al., 2002).

O Glucantime®, no Brasil, é o medicamento de primeira escolha no tratamento da leishmaniose, mesmo apresentando eficácia limitada, efeitos tóxicos e colaterais consideráveis e restrição no tratamento de alguns pacientes como gestantes e coinfectados com o HIV (AMATO et al., 2000). Se administrado corretamente, esse fármaco é eficaz contra as leishmanioses cutânea, mucocutânea, difusa e visceral, provocando redução rápida das manifestações clínicas e hematológicas da doença e esterilização dos parasitas. Por sua vez, baixas dosagens ou descontinuidade do tratamento podem levar à falha terapêutica, bem como resistência do parasito (RATH et al., 2003). A administração desse medicamento pode ser feita por via intramuscular ou endovenosa e recomenda-se o uso de 15 a 20 mg/ Sb^V /Kg/dia por no mínimo 20 dias e no máximo 40 dias, nunca ultrapassando 850 mg/ Sb^V no tratamento (PELISSARI et al., 2011). No entanto, na dose de 20mg/ Sb^V /Kg/dia a droga pode atingir seu limiar de toxicidade e causar alterações cardíacas, pancreáticas e/ou renais (BRASIL, 2009). Os pontos positivos do tratamento com antimoniais são o baixo custo e a eficácia de >90-95% dos casos tratados e os pontos negativos são os altos índices de resistência do parasito, o longo período de tratamento com doses altas, a administração parenteral dolorosa e a toxicidade causada (MICHELETTI; BEATRIZ, 2012; PAVLI; MALTEZOU, 2010).

2.3.2 Anfotericina B e Anfotericina B lipossomal

O Desoxicolato de Anfotericina B é um antibiótico derivado de uma cepa da bactéria *Streptomyces nodosus*, com excelente ação *in vitro* contra as formas

amastigota e promastigota de *Leishmania*. *In vivo*, possui ação leishmanicida, ligando-se ao ergosterol, esteroide da membrana plasmática do parasito, alterando a sua permeabilidade e equilíbrio osmótico e causando, como consequência, a sua morte. Esse antibiótico apresenta toxicidade seletiva, uma vez que o ergosterol não está presente na membrana plasmática de células animais (SOARES-BEZERRA; LEON; GENESTRA, 2004). A administração é parenteral e seu uso é bastante restrito devido aos efeitos tóxicos e colaterais que apresenta, considerados inúmeros e frequentes, além do inconveniente tratamento longo (BRASIL, 2009). Outra opção melhor tolerada e menos tóxica desse antibiótico é a Anfotericina B lipossomal (AmBisomeTM), uma incorporação do desoxicolato de Anfotericina B em lipossomas carregadores. Estes são absorvidos pelas células do SFM, sendo, desse modo, pouco absorvidos pelos rins, órgão afetado pela toxicidade da Anfotericina B. Sua administração é mais eficaz e é feita por via endovenosa (RATH et al., 2003). Essa droga é de primeira linha nos países desenvolvidos como EUA e países da Europa. No Brasil, também é considerada de primeira escolha para pacientes impossibilitados de utilizar os antimoniais pentavalentes como indivíduos coinfectados com o vírus HIV e de segunda escolha para aqueles casos graves que não obtiveram resultado terapêutico com os antimoniais pentavalentes (MOLINA et al., 2007; OLLIARO et al., 2005).

2.3.3 Pentamidina

A pentamidina (Lomidina®), droga de segunda escolha mais recomendada para o tratamento da leishmaniose, é uma diamidina aromática que age, provavelmente, interferindo na síntese do DNA, fragmentando a membrana mitocondrial e alterando morfológicamente o cinetoplasto (AMATO, 2006). No tratamento da LTA, esse fármaco demonstrou ser menos tóxico que os antimoniais pentavalentes, embora tenha causado efeitos colaterais expressivos. Já para o tratamento da leishmaniose visceral, há relato de exacerbação dos efeitos adversos, sendo até mais expressivos do que os apresentados pelos antimoniais (BERMAN, 1997). É uma molécula de grande interesse no tratamento

de casos de leishmaniose visceral e mucocutânea refratária a antimoniais pentavalentes, todavia a administração parenteral e a alta toxicidade são fatores limitantes para seu uso (GIL et al., 2007).

2.3.4 Miltefosina

A Miltefosina (Hexadecilfosfocolina) é uma alquilfosfocolina de ação antineoplásica que tem apresentado efeito leishmanicida *in vitro* e *in vivo*. Inicialmente utilizada na Índia no tratamento de pacientes com leishmaniose refratários aos antimoniais pentavalentes, mostrou-se ser a melhor alternativa para o tratamento da leishmaniose visceral por ser administrada por via oral, considerada como o principal avanço da quimioterapia para leishmaniose (SUNDAR et al., 2000; SINGH et al., 2014). O mecanismo de ação da Miltefosina ainda não é bem compreendido. Sabe-se que ela é capaz de bloquear a síntese da membrana plasmática do parasito e alterar sua composição, além de levá-lo a apoptose (AMATO, 2006). É altamente efetiva em crianças, mas pode causar problemas gastrointestinais; em gestantes, há restrições para o uso por possuir efeito teratogênico (MICHELETTI; BEATRIZ, 2012). Segundo Bryceson (2001) a meia vida longa deste medicamento pode incentivar o surgimento de resistência do parasito e, aliado a isso, a teratogenicidade e a baixa janela terapêutica representam limitações para o uso (CROFT; SEIFERT; YARDLEY, 2006).

2.3.5 Paromomicina

Outro medicamento utilizado no tratamento da leishmaniose é a Paromomicina, um antibiótico aminoglicosídeo injetável, que tem atividade *in vivo* e *in vitro* contra espécies de *Leishmania* (RATH et al., 2003). A paromomicina é eficaz tanto na leishmaniose cutânea quanto na visceral. O seu mecanismo de ação ainda é pouco conhecido, mas os ribossomos têm sido implicados como alvo, através da ligação da droga às proteínas ribossômicas, inibindo a síntese de RNA e conseqüentemente a síntese proteica (SINGH, N.; KUMAR; SINGH, R.,

2012). Os efeitos colaterais apresentados são ototoxicidade e nefrotoxicidade, sendo considerada uma droga adequada no tratamento de segunda linha, quando houver resistência aos antimoniais (MONGE-MAILLO; LÓPEZ-VÉLEZ, 2013).

2.4 MECANISMOS DE RESISTÊNCIA

A resistência clínica ou adquirida apresentada pelas cepas de *Leishmania* aos quimioterápicos atuais é um sério problema para o tratamento da leishmaniose. O uso do medicamento adequado pode ser dificultado pela sensibilidade da espécie do parasito à droga, pela variação da farmacocinética e pela interação do sistema imune do hospedeiro com o fármaco. Em relação à sensibilidade do parasito à droga, sabe-se que há diferenças bioquímicas e moleculares entre as diferentes espécies/cepas de *Leishmania*; dessa forma, ocorre uma variação intrínseca na resposta ao medicamento. Mecanismos como diminuição do nível intracelular da droga, alteração no alvo do medicamento ou superexpressão de moléculas envolvidas na reparação de danos causados pelo fármaco são adaptações do parasito que resultam em resistência. A farmacocinética do medicamento também determina a eficácia do tratamento. Assim, o local onde o fármaco é metabolizado e o tempo da sua eliminação pelo organismo apontam para o sucesso ou não da terapia. Além disso, o tipo de resposta imune do indivíduo influencia diretamente no tratamento utilizado, pois uma resposta imune celular efetiva contra o patógeno é importante para a prevenção de recaídas e para o controle da infecção (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

Todos os medicamentos utilizados no tratamento da leishmaniose, até o momento, estão envolvidos em casos de resistência parasitária. O mau uso da droga, como dosagem incorreta e abandono do tratamento, contribui significativamente para a falha terapêutica e, conseqüentemente, para o desenvolvimento de resistência pelo parasito.

Relatos de resistência ao antimonial pentavalente, medicamento de primeira linha no tratamento da leishmaniose em áreas endêmicas, têm sido observados em todo o mundo, nos últimos 15 anos. Na Índia, uma sequência de

mudanças nas doses e tempo de tratamento com o antimônio pentavalente, em pacientes com LV, levou ao surgimento de casos de resistência e à seleção de cepas resistentes, as quais foram rapidamente propagadas, devido ao ciclo antroponótico (ser humano como único hospedeiro) de transmissão. Ainda, foi observado que apenas 64% dos novos casos de LV na região de Bihar eram sensíveis ao antimonial e, em alguns distritos, havia 100% de casos resistentes; devido a isso, o tratamento com antimoniais foi banido desse país (MOHAPATRA, 2014).

Os mecanismos pelos quais *Leishmania* spp. adquirem resistência ao antimônio são muito estudados, mas continuam contraditórios. Além da sensibilidade diferenciada que as espécies de *Leishmania* apresentam ao antimonial (NAVIN et al., 1992), outros mecanismos estão envolvidos na resistência, como: diminuição da absorção da droga (GOURBAL et al., 2004), aumento do seu efluxo com redução da concentração da droga dentro do parasita (DEY et al., 1994), inibição da ativação da droga, aumento no nível de tiol intracelular com conseqüente redução da formação de antimônio trivalente (MANDAL et al., 2007).

O mecanismo de resistência associado ao tratamento com Anfotericina B foi proposto por Purkait et al. (2012). Observou-se em isolados clínicos de *L. donovani* resistentes a esse fármaco, uma maior fluidez da membrana plasmática, bem como a substituição do ergosterol por um esteroide precursor, indicando uma diminuição da afinidade da Anfotericina B com o parasito, que é evidenciada pela redução de sua absorção. O nível de expressão do gene MDR1 (*multidrug resistance*) foi considerado maior nos isolados resistentes, sugerindo um maior efluxo da droga. Além disso, a cascata da triparedoxina, bem como os níveis de tiol também se apresentaram mais expressos nos isolados resistentes.

A Pentamidina também aparece envolvida em casos de resistência na leishmaniose. De acordo com Basselin et al. (2002), clones de promastigotas de *L. mexicana*, resistentes à Pentamidina, apresentaram redução na absorção e aumento no efluxo da droga, quando comparados a cepas selvagens. Ainda, foi observado que a droga, na cepa selvagem, acumula-se no interior da mitocôndria, enquanto nos parasitos resistentes, houve ausência total da droga no interior dessa organela.

O mecanismo de resistência envolvido na terapia com a Miltefosina, proposto por Seifert et al. (2003), foi a inativação de genes de *L. donovani*, associados com a absorção da droga, tais como o *Multidrug resistance P-glycoprotein*.

Em relação à Paromomicina, Jhingran et al. (2009) observaram uma diminuição no potencial de membrana mitocondrial em clones de *L. donovani* resistentes, depois de 72h de tratamento com a droga, sugerindo que esta organela seria o alvo final do fármaco. Além disso, a síntese proteica e o acúmulo da droga pelo parasito, também se mostraram reduzidos.

2.5 PRODUTOS NATURAIS

A utilização de produtos naturais para tratamento de diversas doenças ocorre desde os primórdios da humanidade. O poder de cura de muitas espécies da flora mundial foi descoberto pela comunidade popular de países desenvolvidos ou em desenvolvimento, a qual tratava, dessa forma, uma ampla gama de enfermidades, passando o conhecimento através das gerações. Com o advento da medicina e a produção incessante de fármacos alopáticos, o saber popular tornou-se desvalorizado pelos profissionais de saúde e perdeu espaço, principalmente nos países desenvolvidos. No entanto, atualmente, a ciência e as políticas de saúde estão buscando restabelecer o uso de plantas medicinais pela população, não só pelos benefícios de se ter hábitos saudáveis, mas também devido ao difícil tratamento de algumas doenças, desenvolvimento de resistência microbiana e o alto custo dos medicamentos sintéticos (FEIJÓ et al., 2012; SOUZA-MOREIRA; SALGADO; PIETRO, 2010).

A partir do conhecimento popular, pesquisas científicas são desenvolvidas, utilizando as plantas como ferramenta de estudo. A identificação de espécies vegetais com potencial medicinal aliada às recentes tecnologias de separação de compostos aumenta a probabilidade de encontrar produtos como extratos de plantas ou metabólitos ativos que sejam indicados para o desenvolvimento de novas terapias. Para a indústria farmacêutica, os produtos naturais são de grande valia, quer seja no seu uso para a obtenção de fármacos (que são as substâncias

ativas isoladas) ou para a obtenção de adjuvantes (produtos utilizados na formulação do medicamento). Além disso, ainda há produção dos medicamentos fitoterápicos que são exclusivamente à base de extratos vegetais (RIBEIRO et al., 2014; SIMÕES; SCHENKEL, 2002).

Dessa forma, os produtos naturais de origem vegetal são uma fonte potencial de novos agentes terapêuticos para o tratamento de diversas doenças, especialmente as negligenciadas como a leishmaniose. Vários estudos já demonstraram atividade leishmanicida de plantas tradicionalmente utilizadas no Brasil (BEZERRA et al., 2006; BRAGA et al., 2007; BRITO et al., 2013; CLAUDINO et al., 2013; FIGUEREDO et al., 2014; RIBEIRO et al., 2014; ROCHA et al., 2005; SILVA et al., 2014).

A Organização Mundial de Saúde preconiza o uso da medicina tradicional onde os serviços apropriados de saúde são inacessíveis e defende que as plantas são a maior e melhor fonte de medicamentos para a humanidade (ROCHA et al., 2005). No Brasil, o Ministério da Saúde, com o intuito de implantar as terapias complementares no Sistema Único de Saúde (SUS) e promover pesquisas com plantas medicinais, bem como o uso correto destas e de fitoterápicos, elaborou em 2006, a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos (Decreto nº 5.813/2006) (BRASIL, 2006). Em 2009, foi elaborada a Relação Nacional de Plantas de Interesse ao SUS (RENISUS) que contém uma lista com 71 espécies de plantas medicinais indicadas para uso terapêutico da população, dentre elas, duas espécies são do gênero *Croton* L.(HPMED, 2014).

2.5.1 Gênero *Croton* L.

O gênero *Croton* pertence à família Euphorbiaceae, subfamília Crotonoideae e tribo Crotoneae. A família Euphorbiaceae contém mais de oito mil espécies de plantas, algumas conhecidas pelo seu poder medicinal e/ou efeitos tóxicos. Estas espécies distribuem-se por regiões tropicais e temperadas em todo o mundo (ABREU et al., 2001). *Croton* é um dos maiores gêneros de Angiospermas e o segundo maior gênero dessa família. Com mais de 1200 espécies entre árvores, arbustos e ervas reconhecidas no *World Checklist and*

Bibliography of Euphorbiaceae (GOVAERTS; FRODIN; RADCLIFFE-SMITH, 2000), suas espécies distribuem-se por regiões tropicais e subtropicais dos hemisférios norte e sul. Da América do Sul, o Brasil é o país que concentra o maior número de espécies, aproximadamente 350, distribuídas em diversos ambientes, com destaque para o cerrado, a caatinga e os campos rupestres (SILVA et al., 2010).

As espécies desse gênero são geralmente odoríferas e contém um látex cáustico que causa dermatite e pode ser venenoso. Suas folhas, sementes, cascas do caule e raízes são frequentemente usadas na medicina popular como chás, infusões ou emplastos para aliviar a dor, problemas digestivos como constipação ou diarreia, febre e hipertensão, entre outros. Há na literatura relato de ação analgésica, antioxidante, imunomodulatória, anti-inflamatória, antiespasmódica, antiulcerogênica, antidiabética, anticancerígena, antibacteriana, antifúngica, antiviral, antimalárica e leishmanicida atribuída ao gênero *Croton* (MELO et al., 2013; PALMEIRA-JÚNIOR et al., 2006; SALATINO; SALATINO; NEGRI, 2007).

Espécies desse gênero são de grande importância econômica para a indústria farmacêutica, devido à variedade de metabólitos secundários que apresenta, tais como: alcaloides, terpenoides e flavonoides (SIQUEIRA, 2013).

2.5.2 Espécie *Croton blanchetianus* Baill

Popularmente conhecida como marmeleiro, a nomenclatura dessa espécie foi reajustada de *Croton sonderianus* Mull. Arg para *Croton blanchetianus* Baill, por Govaerts, Frodin e Radcliffe-Smith (2000). *C. blanchetianus* é uma espécie tipicamente brasileira, restrita ao semiárido, distribuindo-se pelos estados do Nordeste (Alagoas, Bahia, Ceará, Paraíba, Pernambuco, Piauí, Rio Grande do Norte e Sergipe) e Sudeste (Minas Gerais) em vegetação de carrasco e caatinga. É usada na medicina popular no tratamento de hemorragia uterina, hemoptise, dor de estômago, vômito, diarreia, reumatismo e cefaleia (AMARAL, 2004; ANGÉLICO, 2011).

Suas características botânicas são ramos pecíolos quase cilíndricos, folhas simples triangular-ovais medindo 10-14 cm de comprimento por 5-7 cm de largura, apresentando na parte inferior delicado indumento de pelos estrelados de cor acinzentada, às vezes com brilho vítreo; os racemos possuem abundantes flores esbranquiçadas, pequenas e em espigas terminais, sendo que as flores femininas não possuem pétalas; frutos do tipo cápsula e com sementes brilhantes; o caule é ereto e possui cor vermelho-escura. É um arbusto lenhoso, podendo chegar a pequena árvore, raramente atinge mais de 7 metros de altura (Figura 9) (ALBUQUERQUE, 2010a; GONÇALVES, 2007; SILVEIRA, 1979 *apud* ANGÉLICO, 2011).



Figura 09. Aspecto botânico de *Croton blanchetianus* Baill. A: aspecto geral da planta; B: detalhe das flores; C: detalhe dos frutos.

Fonte: Albuquerque, 2010b.

Os constituintes voláteis e não voláteis das plantas do gênero *Croton* são frequentemente objetos de estudo. Com predominância de hidrocarbonetos monoterpênicos e hidrocarbonetos sesquiterpênicos (SANTANA, 2011), o óleo essencial de *Croton blanchetianus* apresenta propriedades anti-inflamatória, antinociceptiva, gastroprotetora (AMARAL, 2004), analgésica, antioxidante, antimicrobiana, fungicida (MCCHESENEY; CLARCK; SILVEIRA, 1991), larvicida contra *Aedes Aegypti* (MORAIS et al., 2006) e leishmanicida sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. infantum chagasi* (COSSOLOSSO, 2013).

Devido à grande variedade de usos na medicina popular, bem como de seus efeitos terapêuticos já comprovados, estudos sobre o potencial farmacológico do extrato ou de componentes isolados de *Croton blanchetianus*, mostram-se bastante promissores.

3 JUSTIFICATIVA

Considerada uma doença negligenciada, a leishmaniose é um sério problema de saúde pública em todo o mundo. Em atual expansão para os grandes centros urbanos, com o aumento do número de casos e surgimento de resistência parasitária, seu controle parece estar comprometido. A melhor maneira de controlar essa doença seria a vacinação, mas enquanto nenhuma vacina é implantada e, ao que parece, em curto prazo não será, vários outros medicamentos são testados atualmente. Dada a importância do tratamento na política de controle dessa parasitose, torna-se necessária a busca por novos compostos bioativos com atividade leishmanicida que sejam eficientes, atóxicos e de baixo custo. Com este propósito, o uso de produtos naturais, a exemplo das plantas, torna-se bastante promissor nessa linha de pesquisa, uma vez que diversas espécies têm mostrado atividade frente às leishmanias, dentre elas, espécies do gênero *Croton*, cuja distribuição geográfica se faz também no estado de Sergipe. O óleo essencial da espécie *C. blanchetianus* possui atividade leishmanicida já comprovada sobre a forma promastigota de *Leishmania*; no entanto, nada se sabe a respeito do seu efeito sobre a forma amastigota, encontrada nos hospedeiros mamíferos, tampouco se o extrato bruto dessa planta apresenta o mesmo efeito leishmanicida. Desse modo, estudos nessa linha de pesquisa são dotados de grande relevância científica, pois apontam compostos potenciais para o tratamento da leishmaniose.

4 OBJETIVOS

4.1 GERAL

Avaliar a atividade leishmanicida do extrato etanólico bruto de *Croton blanchetianus* Baill sobre *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*.

4.2 ESPECÍFICOS

- Determinar a atividade leishmanicida do extrato etanólico bruto de *Croton blanchetianus* Baill sobre promastigotas de *Leishmania amazonenses* e *Leishmania infantum*;
- Determinar a atividade leishmanicida do extrato etanólico bruto de *Croton blanchetianus* Baill sobre amastigotas de *Leishmania amazonenses* e *Leishmania infantum*;
- Verificar *in vitro* a citotoxicidade do extrato etanólico bruto de *Croton blanchetianus* Baill sobre macrófagos murinos;
- Avaliar o efeito imunomodulador do extrato etanólico bruto de *Croton blanchetianus* Baill sobre macrófagos murinos;
- Observar a morfologia das formas promastigotas de *Leishmania amazonenses* e *Leishmania infantum* submetidas ao tratamento com o extrato etanólico bruto de *Croton blanchetianus* Baill.

5 MATERIAL E MÉTODOS

5.1 PARASITOS E ANIMAIS

Amastigotas de *Leishmania amazonensis* (MHOM/BR/75/LTB0016) foram isolados e mantidos em camundongos Balb/c e amastigotas de *Leishmania infantum* (MHOM/MA67ITNAB263) foram isolados de hamsters infectados e mantidos em camundongos Balb/c. O cultivo das formas promastigotas foi feito em meio Schneider Insect (SIGMA®, St. Louis, MO, EUA) suplementado com 10% e 20% de soro fetal bovino (SFB), respectivamente para cada espécie, e 100 U/ml de penicilina e 100 µg/ml de estreptomicina. Os promastigotas de ambas as espécies foram mantidos em cultura, em incubadora B.O.D (Demanda Bioquímica de Oxigênio) a 26°C por meio de passagens sucessivas para meios novos a cada quatro dias, por no máximo dez passagens.

Para os ensaios *in vitro* com macrófagos murinos foram utilizados camundongos (*Mus musculus*) BALB/c, fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório da FIOCRUZ (CECAL/FIOCRUZ-RJ). O protocolo utilizado neste trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz (LW-07/10).

Todos os experimentos realizados neste trabalho foram conduzidos no Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos da Fundação Oswaldo Cruz (LBqT/FIOCRUZ-RJ), sob a supervisão do Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral.

5.2 EXTRATO DE *Croton blanchetianus* Baill

Amostras do marmeleiro (*C. blanchetianus*) foram coletadas na Fazenda Serrote, em Piranhas – Alagoas/Brasil, no dia 06 de julho de 2012 e posteriormente foram identificadas pela Dr.^a Marta Cristina Vieira. A exsicata encontra-se depositada no Herbário da Universidade Federal de Sergipe, sob o registro de número ASE 24664. O extrato etanólico de *C. blanchetianus* foi gentilmente cedido pelo Dr. Charles Santos Estevam (Departamento de Fisiologia da Universidade Federal de Sergipe).

A extração do extrato foi feita por maceração do pó da entrecasca de *C. blanchetianus* com etanol 90%, durante cinco dias. Após concentração do solvente em evaporador rotativo sob pressão reduzida, o extrato foi suspenso em uma solução de metanol hidratado (2:3) e extraído exaustivamente e sucessivamente com *n*-hexano, clorofórmio e acetato de etila.

5.3 ATIVIDADE ANTIPROMASTIGOTA

Para o ensaio da atividade antipromastigota, o extrato foi solubilizado em DMSO (dimetilsulfóxido) a uma concentração inicial de 100 mg/ml e posteriormente solubilizado em meio Schneider para as concentrações de uso (50–500 µg/ml). A concentração final de DMSO foi de 0,5% na maior concentração do extrato, concentração esta que não é considerada tóxica para o parasito (OLIVEIRA et al., 2009).

Promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*, em fase logarítmica de crescimento, foram ajustados para uma concentração de 5×10^6 parasitos/ml, utilizando-se no ensaio um volume de 100 µl, o qual foi incubado em placas de cultura celular de 96 poços, na presença de diferentes concentrações do extrato (50, 100, 150, 200, 250, 300, 350, 400, 450 e 500 µg/ml), totalizando um volume de 200 µl. O período de incubação utilizado foi de 24 e 72h, a 26°C. Cada experimento foi realizado em triplicata técnica e biológica e como controle foi utilizada a mesma concentração de promastigotas, incubada na ausência do extrato.

Para verificar a viabilidade dos promastigotas foi utilizado o método do Alamar Blue®, que consiste na redução da resazurina, um corante azul não fluorescente a resofurina, de coloração rósea e fluorescente, por células viáveis. Ao final do tempo de incubação com o extrato de *C. blanchetianus*, foram adicionados 20 µl de resazurina (concentração final de 50µM) a cada poço e após três horas, a viabilidade celular foi mensurada em fluorímetro, usando um comprimento de excitação de 555nm e 585nm de emissão. Os resultados foram expressos como porcentagem de células viáveis.

5.4 ATIVIDADE ANTIAMASTIGOTA

Para o ensaio da atividade anti-amastigota, o extrato foi solubilizado em DMSO a uma concentração inicial de 200 mg/ml e posteriormente solubilizado em meio RPMI para as concentrações de uso (3–30 µg/ml). A concentração final de DMSO utilizada foi de 0,015%, na maior dose utilizada do extrato.

Para obtenção dos macrófagos murinos, camundongos BALB/c foram sedados com Quetamina (Ketalar), via intraperitoneal, e eutanasiados em câmara de CO₂. Foi feita a lavagem da cavidade peritoneal com meio RPMI (SIGMA®, St. Louis, MO, EUA) gelado suplementado com 10% de SFB, glutamina e piruvato. Após a retirada do RPMI do peritônio, os macrófagos foram ajustados para uma concentração final de 2x10⁶ células/ml. Um volume de 400 µl contendo esta concentração de células foi incubado em lâminas LAB-TEK (Nunc, Nova Iorque, EUA) em estufa a 37°C e 5% CO₂ por 1 hora, para adesão celular e, após esse tempo, as lâminas foram lavadas com RPMI para a retirada das células que não aderiram. Os macrófagos aderidos foram infectados com promastigotas de *L. amazonensis* ou de *L. infantum* e incubados em estufa a 37°C e 5% CO₂. Na infecção com *L. amazonensis* foi utilizada uma proporção de 3 promastigotas para cada macrófago (3:1) por um período de incubação de 3 horas; na infecção com *L. infantum*, foram ajustados 5 promastigotas para cada macrófago (5:1) por um período de 5 horas de incubação. Após a infecção, as lâminas foram lavadas com RPMI a 37°C para a retirada dos promastigotas extracelulares e tratadas com as devidas concentrações do extrato bruto de *C. blanchetianus* (3, 5, 7, 10, 20, 30 µg/ml), por um período de incubação de 72 horas. Ao término do tempo de incubação as lâminas foram lavadas com RPMI a 37°C e coradas com corante hematológico Instant Prov (Newprov, Curitiba, Brasil). A atividade anti-amastigota do extrato foi verificada por contagem em microscópio de luz, no aumento de 1000x, contando-se em diversos campos, aproximadamente 300 macrófagos por amostra. O ensaio foi realizado em no mínimo duplicata técnica e biológica. O índice de infecção foi, então, calculado pela seguinte fórmula:

$$IF = \% \text{ de macrófagos infectados} \times \text{número de amastigotas} / \text{número macrófagos totais}$$

5.5 VIABILIDADE DOS MACRÓFAGOS

Um volume de 200 μL de meio RPMI contendo macrófagos murinos peritoneais (2×10^6 células/ml) foi plaqueado em placas de cultura celular de 96 poços, submetido ao tratamento com concentrações seriadas de duas vezes do extrato (120 $\mu\text{g/ml}$ - 1,9 $\mu\text{g/ml}$) e incubado em estufa a 37°C e 5% CO_2 , por 72 horas. Após o período de incubação, foram adicionados a cada poço, 20 μl de resazurina a uma concentração final de 50 μM . A placa foi novamente incubada por mais 4 horas nas mesmas condições e, ao término, a viabilidade foi mensurada em fluorímetro, usando um comprimento de excitação de 555nm e 585nm de emissão. O experimento foi realizado em triplicata técnica e biológica. Os resultados foram expressos em porcentagem de células viáveis. A concentração final de DMSO utilizada foi de 0,06%, na maior dose utilizada do extrato. O Tritton foi utilizado como controle positivo.

5.6 DOSAGEM DE NITRITO

Os sobrenadantes das culturas de macrófagos não infectados e infectados, tratados posteriormente com o extrato, foram analisados quanto à produção de nitrito, produto de degradação do óxido nítrico, pelo método de Griess (GREEN et al., 1982). Para quantificar a produção de nitrito, alíquotas de 50 μl do sobrenadante foram incubadas com 50 μl do reagente de Griess [1:1, de solução de sulfanilamida 1% e solução de N-(1-naftil) etiletodiamina dicloridrato 0,1% em 2,5% de H_3PO_4] em placas de cultura celular de 96 poços a 25°C por 10 minutos. As concentrações de nitrito foram calculadas a partir de uma curva padrão de nitrito de sódio (NaNO_2). A leitura foi realizada em espectrofotômetro, usando um comprimento de onda de 540nm.

5.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

O cálculo do IC₅₀ para as atividades antipromastigota, antiamastigota e viabilidade dos macrófagos, foi obtido por meio da análise de regressão logarítmica pelo programa *GraphPad Prism* 5.0.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Atualmente, todos os medicamentos disponíveis utilizados na quimioterapia da leishmaniose estão envolvidos em falha terapêutica, efeitos colaterais, toxicidade, desenvolvimento de resistência parasitária, além de apresentarem alto custo (RIBEIRO et al., 2014). Nesse sentido, pesquisas científicas que propõem novos agentes com atividade biológica contra as espécies de *Leishmania* e que solucionem a problemática apresentada pelas drogas que estão em uso, são altamente oportunas (FIGUEREDO et al., 2014). Nesse contexto, os produtos naturais de origem vegetal podem fornecer moléculas que apresentem atividade potencial contra as leishmanias, pois além de apresentarem grande disponibilidade e diversidade de espécies e de compostos químicos, são de baixo custo e causam reduzida toxicidade no ser humano (PAES-GONÇALVES et al., 2012).

Neste estudo, foram avaliados a atividade do extrato bruto etanólico de *Croton blanchetianus* sobre promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* e *Leishmania infantum*, bem como o seu efeito citotóxico e de imunomodulação em macrófagos murinos peritoneais. Os resultados das atividades antipromastigota e anti-amastigota foram representados em IC₅₀ (concentração inibitória do extrato necessária para inibir 50% das formas promastigotas ou amastigotas) e o efeito citotóxico do extrato sobre os macrófagos foi representado em LD₅₀ (dose necessária para inibir 50% das células testadas).

6.1 ATIVIDADE ANTIPROMASTIGOTA

Nos ensaios da atividade antipromastigota, 5×10^5 parasitos totais foram incubados com doses crescentes do extrato, por um período de 24 ou 72 horas. O extrato utilizado mostrou atividade leishmanicida sobre a forma promastigota do parasito em ambas as espécies testadas. Em *L. amazonensis*, o extrato apresentou uma melhor atividade com um IC₅₀ de 73,6 µg/ml em 24 horas de

incubação, e IC₅₀ de 42,6 µg/ml com 72 horas de incubação. Em *L. infantum*, o efeito do extrato foi menos eficiente, com um IC₅₀ superior a 2 vezes ao encontrado para *L. amazonensis* (208,7 µg/ml em 24 horas e 108,9 µg/ml em 72 horas). Além disso, com o aumento de 24 para 72 horas de incubação houve uma redução de aproximadamente 50% no IC₅₀ de cada uma das espécies, como demonstrado na Tabela 3. Em relação à redução da viabilidade, *L. amazonensis* apresentou um percentual de morte de 68,8%, com 100 µg/ml do extrato, em 24 horas de incubação e aproximadamente 100%, em 72 horas de incubação; enquanto que em *L. infantum*, este nível de redução só foi observado no tratamento com 250 µg/ml do extrato. (Figura 10).

Tabela 3. Atividade leishmanicida do extrato etanólico bruto de *Croton blanchetianus* em promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*.

	IC ₅₀ µg/ml (intervalo de confiança)	
	24h	72h
<i>L. amazonensis</i>	73,6 (63,01 - 85,96)	42,6 (37,20 - 48,86)
<i>L. infantum</i>	208,7 (176,70 - 246,50)	108,9 (102,30 - 115,80)

Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média das três repetições. $\alpha=0,05$.

Segundo Braga et al. (2007), o fato de *L. amazonensis* causar todas as formas clínicas de leishmaniose tegumentar e *L. infantum* causar leishmaniose visceral, indica que existem variações entre as espécies dos parasitos citados, as quais podem explicar padrões diferenciados de sensibilidade a drogas entre espécies distintas. Portanto, uma diferença no nível de inibição do extrato etanólico de *C. blanchetianus* sobre as espécies utilizadas neste trabalho já era esperada.

Não há na literatura registros de trabalhos que demonstrem a atividade leishmanicida do extrato bruto de *C. blanchetianus*. O primeiro trabalho a demonstrar a atividade leishmanicida de plantas do gênero *Croton* foi apresentado por Rosa et al. (2003), no qual a fração rica em linalol do óleo

essencial de folhas de *C. cajucara* resultou em um IC₅₀ de aproximadamente 8 ng/ml em promastigotas e em amastigotas de *L. amazonensis*.

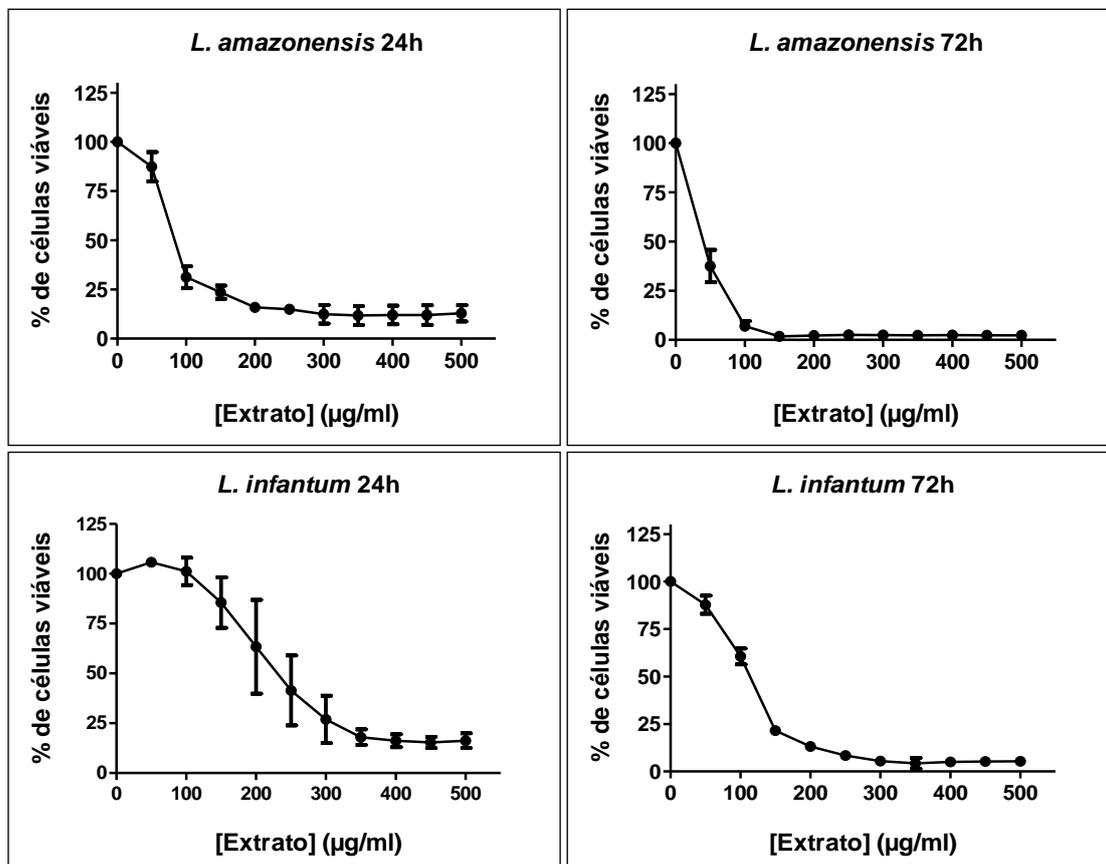


Figura 10. Atividade leishmanicida do extrato etanólico bruto de *C. blanchetianus* sobre promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*. Os dados são apresentados como média de três experimentos diferentes realizados em triplicata. $\alpha=0,05$.

Recentemente, a atividade leishmanicida do óleo essencial de *C. blanchetianus* foi testada por Cossolosso (2013), contra formas promastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum chagasi*, por um período de 24 horas de incubação. O IC₅₀ apresentado em *L. amazonensis* foi de $44,7 \pm 5,99$ µg/ml e em *L. i. chagasi* foi de $13,49 \pm 1,55$ µg/ml. Desse modo, comparado com os resultados obtidos no presente trabalho, o óleo essencial de *C. blanchetianus* avaliado por Cossolosso mostrou uma concentração inibitória menor nas duas espécies testadas. Além disso, ao contrário do observado para o extrato, a ação do óleo foi mais eficiente

contra a espécie *L. i. chagasi*. Além de possíveis variações bioquímicas entre as cepas utilizadas neste trabalho e no de Cossolosso, essa diferença entre os resultados pode ser explicada pelo fato dos óleos essenciais serem mais concentrados do que os extratos, já que nestes é considerada apenas a parte solúvel e naqueles é considerada a totalidade dos compostos presentes (SILVA, 2010).

Considerando que produtos naturais provenientes de plantas como extrato e óleos essenciais são formados por diversos compostos químicos, a ação conjunta destes compostos pode responder pela sua atividade leishmanicida. A caracterização química do extrato de *C. blanchetianus* utilizada no presente estudo ainda não foi realizada. Porém, Angélico (2011) verificou a predominância de flavonoides na composição química do extrato etanólico de folhas de *C. blanchetianus* coletadas no Ceará. Além disso, verificou que o óleo essencial desta espécie apresenta predominância dos componentes monoterpenos (39,2%) e sesquiterpenos (10,3%). Paralelamente, Melo (2011), também verificou a predominância de monoterpenos (59,4%) e sesquiterpenos (40,5%) no óleo essencial das folhas de *C. blanchetianus*, coletadas na Paraíba. Sabe-se que os constituintes químicos das plantas variam de acordo com a flora, localização geográfica, bem como estação da coleta. Contudo, da mesma forma que houve concordância nos resultados de Angélico (2011) e Melo (2011) em relação à composição do óleo essencial desta espécie, há possibilidade do extrato de *C. blanchetianus*, utilizado nesse estudo, ter a composição semelhante à determinada por Angélico (2011). Desse modo, é possível que a morte dos parasitos estudados nesse trabalho seja pela ação dos componentes fenólicos flavonoides (catequinas, taninos, flavononóis e flavononas) encontrados no extrato bruto de *C. blanchetianus*.

Os flavonoides constituem um dos mais abundantes e amplamente distribuídos metabólitos secundários de plantas. Eles proporcionam às plantas cor e sabor, além de possuir função de proteção à infecção microbiana. Sua ação como quelante e sequestrador de radicais livres foi vista por Ostrakhovitch e Afanas'ev (2001). A atividade leishmanicida dessa classe de metabólitos já foi verificada em *L. amazonensis* (ARAÚJO; ALEGRIO; LEON, 1998), *L. peruviana* e *L. braziliensis* (MARÍN et al., 2009), *L. infantum* (RAMÍREZ-MACÍAZ et al., 2012). Recentemente, Inácio, Canto-Cavalheiro e Almeida-Amaral (2013) demonstraram

que a epigalocatequina-3-galato, o mais abundante flavonoide encontrado no chá verde, apresenta atividade leishmanicida *in vitro* e *in vivo*. Foi observado que macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com este flavonoide apresentaram uma diminuição da taxa de infecção de maneira dose dependente. Além disso, camundongos Balb/c infectados com o parasito e tratados com o flavonoide apresentaram diminuição do tamanho das lesões geradas e diminuição da carga parasitária. O mecanismo de ação dos flavonoides sobre as leishmanias foi proposto por Mittra et al. (2000) que concluíram que flavonoides causariam a apoptose do parasito por induzir a clivagem do cinetoplasto. Já em um trabalho conduzido por Cruz et al. (2013) foi demonstrado que os flavonoides, além de alterar o arranjo do DNA mitocondrial, também inibem a enzima arginase, que participa da biossíntese de poliaminas do parasito. Fonseca-Silva et al. (2011), por sua vez, demonstraram que o tratamento de *L. amazonensis* com quercetina, flavonoide mais comum em plantas, aumenta a produção de espécies reativas do oxigênio (ERO), promove disfunção mitocondrial no parasito e inibe o crescimento celular.

6.2 ATIVIDADE ANTIAMASTIGOTA

A forma promastigota de *Leishmania* é amplamente utilizada em estudos sobre a atividade leishmanicida de plantas (BRITO et al., 2013). Isso se deve a maior facilidade de mantê-las em cultura, ou seja, em condições *in vitro*. Todavia, mesmo sendo necessárias avaliações com promastigotas, para ter um valor indicativo de uma possível atividade leishmanicida do composto testado, é imprescindível que sejam realizados testes na forma que sobrevive intracelularmente no ser humano e é responsável pela patogenicidade da doença, ou seja, a amastigota, demonstrando dessa forma, se há uma boa ação do composto *in vitro*.

Para a análise da atividade anti-amastigota do extrato bruto etanólico de *C. blanchetianus* foram utilizados macrófagos murinos para a infecção com o parasito e posterior tratamento com diferentes doses do extrato por 72 horas. O resultado mostrou uma inibição dose-dependente nas duas espécies de

Leishmania utilizadas. Os valores do IC₅₀ obtidos foram 3,10 µg/ml e 8,83 µg/ml para *L. amazonensis* e *L. infantum*, respectivamente (Tabela 4).

Tabela 4. Atividade leishmanicida do extrato etanólico bruto de *Croton blanchetianus* em amastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum*.

	IC ₅₀ µg /ml (intervalo de confiança)
<i>L. amazonensis</i>	3,10 (2,42 a 3,79)
<i>L. infantum</i>	8,83 (7,43 a 10,24)

Os ensaios foram realizados em triplicata e os resultados foram expressos como média das três repetições. $\alpha=0,05$.

Mais uma vez, assim como visto em promastigotas, as formas amastigotas de *L. amazonensis* mostraram ser mais sensíveis ao tratamento do que as de *L. infantum*. Na menor concentração testada (3 µg/ml) houve uma redução na viabilidade em *L. amazonensis* de cerca de 44%, enquanto que em *L. infantum*, este nível de redução só foi observado no tratamento com 7 µg/ml (Figura 11). Essa redução pode ser observada por meio do cálculo do índice de infecção (Figura 12).

Comparando a atividade leishmanicida do extrato sobre as formas promastigotas e amastigotas, nas mesmas condições, é possível notar que o potencial do extrato em matar os parasitos foi maior na forma amastigota. A diferença foi aproximadamente 14 vezes maior em *L. amazonensis* e 12 vezes maior em *L. infantum*. Recentemente, Lima (2014) verificou a atividade leishmanicida do extrato hidroalcólico bruto de *C. cajucara* sobre promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*. Sobre promastigotas obteve um IC₅₀ de 18 µg/ml em 24h de tratamento. Já sobre amastigotas axênicas, obteve um IC₅₀ de 15 µg/ml. Dessa forma, observa-se que a atividade leishmanicida encontrada por Lima (2014) foi relativamente similar entre as duas formas de *L. amazonensis*, o que difere do resultado encontrado no presente trabalho.

Além da inibição do extrato utilizado no presente trabalho ser maior sobre a forma amastigota, os resultados aqui descritos apontam um IC₅₀ <10 µg/ml, valor

este que é apontado por Celine e colaboradores como uma atividade anti-amastigota muito boa para um composto natural. Estes autores investigaram a atividade leishmanicida de 94 extratos de plantas sobre amastigotas axênicas de *L. amazonensis* e constataram que apenas oito apresentaram esse padrão de inibição (CELINE et al., 2009).

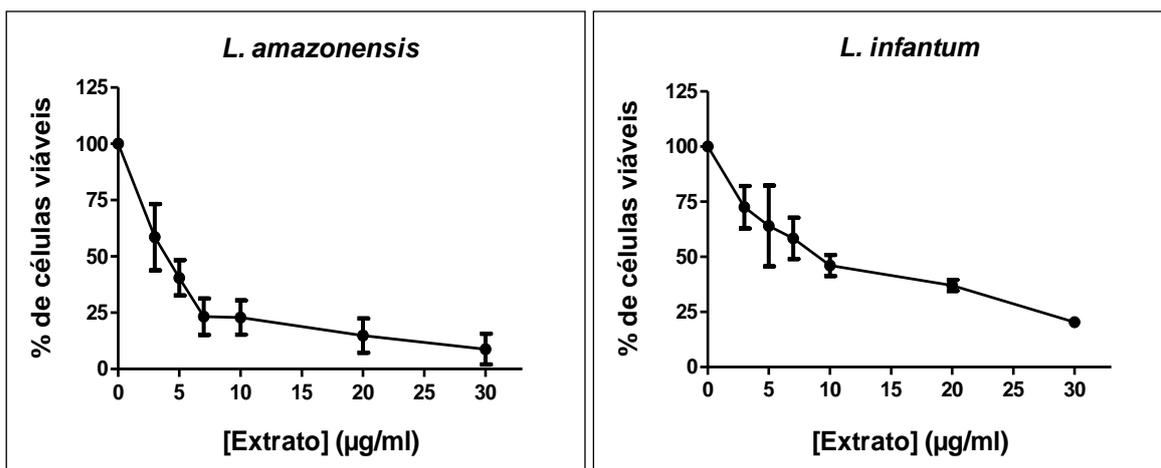


Figura 11. Viabilidade da forma amastigota intracelular de *L. amazonensis* e *L. infantum* ao extrato bruto etanólico de *C. blanchetianus*, em 72 horas de incubação. Os dados são apresentados como média de dois experimentos diferentes realizados em duplicata. $\alpha=0,05$.

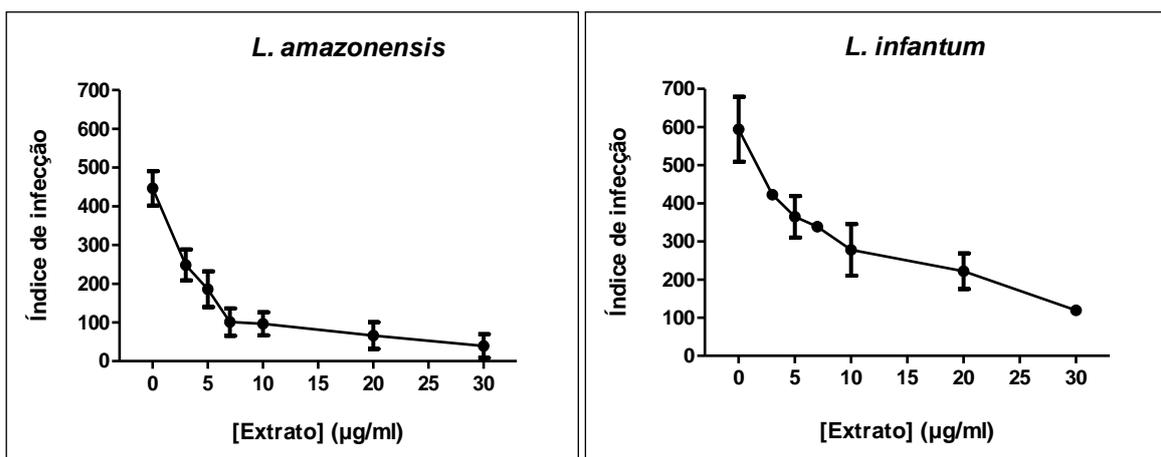


Figura 12. Índice de infecção de macrófagos murinos peritoneais com amastigotas de *L. amazonensis* e *L. infantum* tratados com o extrato bruto etanólico de *C. blanchetianus*. Os dados são apresentados como média de dois experimentos diferentes realizados em duplicata. $\alpha=0,05$.

6.3 CITOTOXICIDADE EM MACRÓFAGOS MURINOS

Para complementar esse estudo, análises sobre a citotoxicidade do composto sobre macrófagos não infectados foram realizadas para demonstrar se a morte dos parasitos é devido a uma atividade citotóxica geral ou se é um processo seletivo sobre as leishmanias.

Desta forma, foi verificado um LD₅₀ de 83,79 µg/ml do extrato etanólico bruto de *C. blanchetianus* sobre macrófagos murinos peritoneais não infectados, no tratamento feito durante 72 horas.

Do mesmo modo, Cossolosso (2013) avaliou a citotoxicidade do óleo essencial de *C. blanchetianus* sobre células monocíticas e concluiu que na dose de 100 µg/ml houve uma citotoxicidade de 50,91%, sendo este óleo menos citotóxico do que o extrato avaliado no presente trabalho. No entanto nenhuma informação é dada pela autora acerca da citotoxicidade apresentada por doses maiores do óleo essencial sobre essas células, tampouco se há efeito tóxico sobre a forma amastigota do parasito.

A razão entre o LD₅₀ dos macrófagos murinos e o IC₅₀ dos amastigotas consiste no Índice de Seletividade (IS). Segundo Weniger et al. (2001), um IS ≥10 sugere uma maior segurança no uso do produto testado em células de mamíferos, pois mostra que a eficácia biológica não é devido à citotoxicidade nessas células. De acordo com os resultados aqui apresentados, o IS para *L. amazonensis* foi de 27,0. Desse modo, verifica-se que o extrato é 27 vezes mais tóxico aos amastigotas de *L. amazonensis* do que ao macrófago, ou seja, o efeito tóxico do extrato está ocorrendo diretamente sobre o amastigota, não afetando toxicamente a célula hospedeira. Já em *L. infantum*, foi verificado um índice de seletividade de 9,5, isso significa que o macrófago não está sofrendo um efeito tóxico significativo do extrato, já que a toxicidade é aproximadamente 10 vezes maior no parasito. Portanto, nota-se, que o extrato de *C. blanchetianus* é capaz de inibir os amastigotas das duas espécies de *Leishmania* testadas, em concentrações baixas (<10 µg/ml), sem, portanto, ser citotóxico para a principal célula de mamíferos envolvida na infecção.

6.4 DOSAGEM DE NITRITO

A ativação do macrófago infectado é o mecanismo primário para eliminar a *Leishmania*. Macrófagos infectados, quando ativados, produzem espécies reativas do oxigênio (ERO) e intermediários reativos do nitrogênio, principalmente o óxido nítrico (NO), que segundo Costa (2007), é um dos mais potentes radicais livres com ação leishmanicida. O NO é produzido pela enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS) que catalisa a conversão de arginina em citrulina e gás de óxido nítrico (MARLETTA, 1994).

Para verificar se a inibição parasitária sobre as formas amastigotas em macrófagos infectados foi influenciada pela produção de NO, foi realizada a dosagem indireta desse radical livre pela quantificação de nitrito em macrófagos não infectados e não tratados com o extrato; macrófagos não infectados e tratados com diferentes concentrações do extrato por 72 horas, e em macrófagos infectados com *L. amazonensis* ou *L. infantum* e tratados com diferentes concentrações do extrato, por 72 horas (Figura 13). Verificamos que macrófagos infectados com *L. amazonensis* e não tratados com o extrato produziram 0,43 μM de nitrito e tratados com 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ do extrato produziram 0,78 μM de nitrito (Figura 13B). Já macrófagos infectados com *L. infantum* e não tratados produziram 0,69 μM de nitrito e tratados com 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ produziram 0,95 μM de nitrito (Figura 13C). O controle feito com macrófagos não infectados e não tratados produziu 0,89 μM de nitrito e os macrófagos não infectados, mas tratados com 30 $\mu\text{g}/\text{ml}$ produziram 1,03 μM de nitrito (Figura 13A). Contudo, as diferenças observadas não foram significativas, indicando que o tratamento com o extrato não induziu a produção do NO pelos macrófagos, independente da infecção pelo parasita. Contrastando com esses resultados, Rosa et al. (2003), utilizando a fração rica em linalol do óleo essencial de *C. cajucara*, constatou que houve modulação nos macrófagos murinos pré-tratados com 15 ng e posteriormente infectados com *L. amazonensis*, havendo um aumento na produção de NO de 220% em relação ao controle.

Por outro lado, é possível notar que nos experimentos com macrófagos infectados houve menor produção de NO quando comparado ao tratamento com macrófagos não infectados, isso pode ser explicado pelo fato da *Leishmania* inibir

a ativação da iNOS e a síntese desse radical livre como já demonstrado por Balestieri et al. (2002).

Desse modo, pode-se inferir que o efeito leishmanicida visualizado nos amastigotas intracelulares, neste trabalho, não esteja sendo influenciado pela ação do óxido nítrico produzido pelo macrófago e seja exclusivo da ação do extrato sobre o parasita.

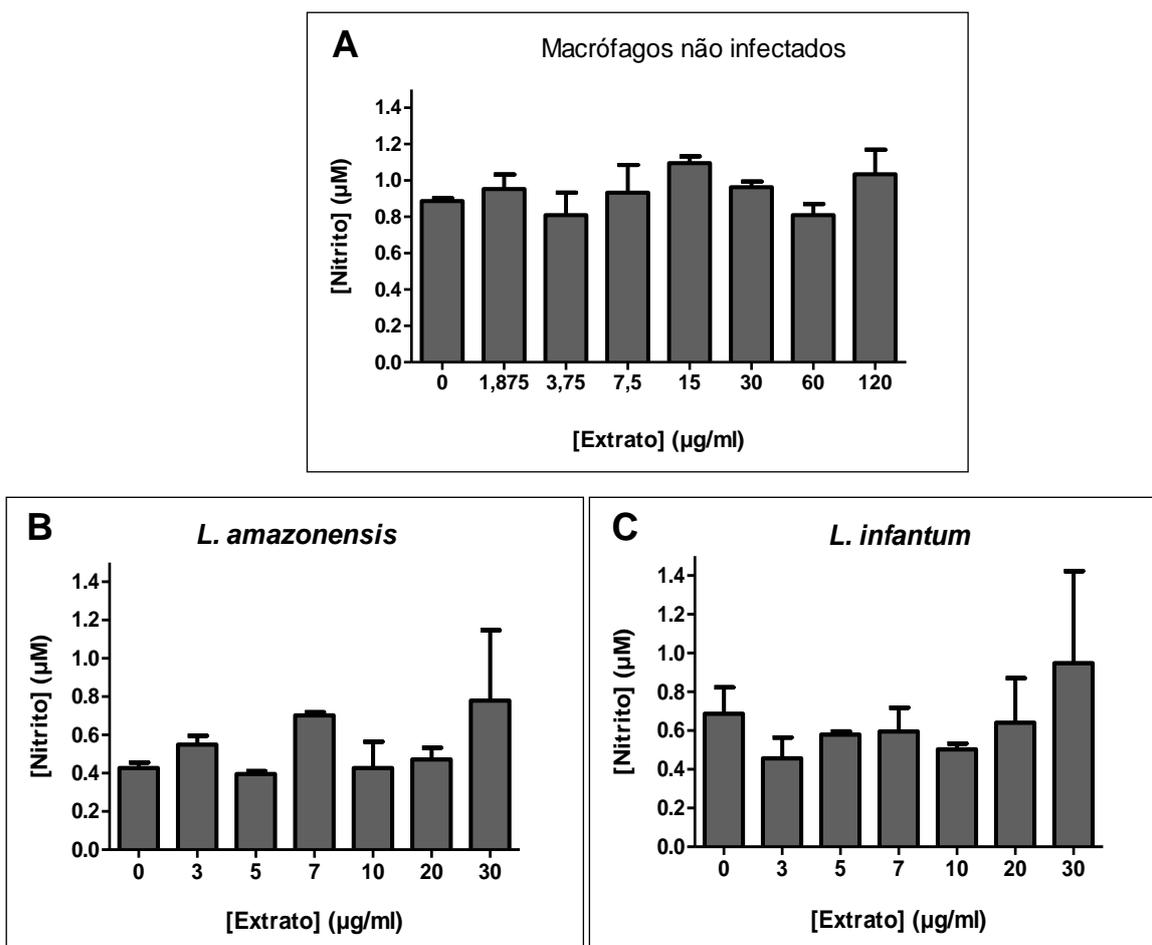


Figura 13. Produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos murinos não infectados (A), infectados com *L. amazonensis* (B) e infectados com *L. infantum* (C) na presença de diferentes concentrações do extrato etanólico de *C. blanchetianus*. Os dados são apresentados como média de dois experimentos diferentes realizados em duplicata. $\alpha=0,05$.

6.5 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS OBSERVADAS EM PROMASTIGOTAS TRATADOS COM O EXTRATO DE *C. blanchetianus*

O mecanismo de ação do extrato de *C. blanchetianus* sobre as leishmanias utilizadas no presente estudo ainda é desconhecido. Componentes químicos do extrato podem estar somente lesionando a membrana do parasito ou podem atravessar a membrana e afetar estruturas presentes apenas no tripanossomatídeo, como é o caso do cinetoplasto. A detecção de alterações morfológicas nas formas promastigotas contribui para a elucidação dos mecanismos de ação do composto testado (ADADE; SOUTO-PADRÓN, 2010). Essas alterações podem ser observadas com o uso de diferentes técnicas de microscopia, as quais indicam desde alterações na superfície celular do parasito até alterações específicas em organelas citoplasmáticas.

Em observação direta por microscopia óptica dos promastigotas tratados com 100 µg/ml do extrato, foram observadas algumas alterações morfológicas importantes como corpo arredondado e presença de dois flagelos (Figura 14).

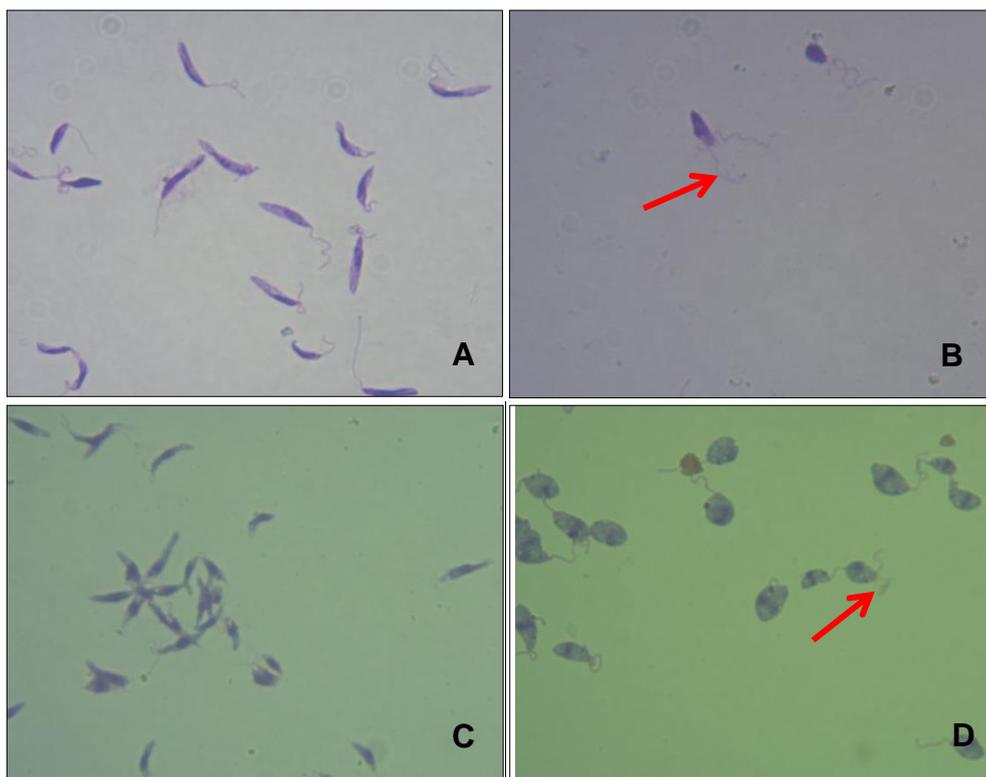


Figura 14. Alterações morfológicas de promastigotas de *L. amazonensis* não tratados com extrato de *C. blanchetianus* (A) e tratados com 100 µg/ml do extrato (B), e de *L. infantum* não tratados (C) e tratados com 100 µg/ml do extrato (D). A seta indica a presença de flagelo duplo. Aumento 1000x.

Alterações semelhantes nas formas promastigotas também foram observadas, através de microscopia óptica, por Silva (2013) no tratamento de *L. amazonensis* com extrato de *Physalis angulata*. Em promastigotas tratados com 50 µg/ml do extrato, foram observadas formas arredondadas com duplo flagelo e redução do tamanho celular. Também verificou, através da microscopia eletrônica de varredura, a ultraestrutura desses promastigotas atípicos e verificou alterações na citocinese, indicando interferência do extrato na divisão celular e multi-septação do corpo celular. Por microscopia eletrônica de transmissão ela verificou uma única bolsa flagelar com dois flagelos, alteração na forma e aumento no tamanho do cinetoplasto e a presença de múltiplas vesículas na bolsa flagelar, que sugerem um aumento na exocitose dos compostos tóxicos presentes no extrato. Guimarães et al. (2010), utilizando um alcaloide isolado de *C. pullei*, verificaram a atividade leishmanicida desse composto contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e, por meio de microscopia eletrônica de transmissão, observaram alterações morfológicas nas formas promastigotas tratadas, tais como: aumento no tamanho do cinetoplasto, condensação da cromatina, presença de estruturas membranosas perto do complexo de Golgi, alguns corpos vesiculares na bolsa flagelar e alterações na membrana plasmática e membrana flagelar. Estes achados, segundo os autores, são indicativos de morte por apoptose e sugerem que a substância testada interfere no tráfego intracelular.

Desse modo, não é possível afirmar o mecanismo de ação do extrato de *C. blanchetianus* sobre as espécies de *Leishmania* aqui estudadas, porém por meio da análise das alterações morfológicas encontradas nas promastigotas, como corpo arredondado e flagelo duplicado, é possível inferir ao menos a interferência do extrato no processo de divisão celular do parasito, já que este ocorre por bipartição, sendo comum a adesão celular das células pré-formadas antes da separação total de ambas.

7 CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho demonstram a atividade leishmanicida do extrato etanólico de *C. blanchetianus* sobre *L. amazonensis* e *L. Infantum* e nos permite concluir que este extrato apresenta maior atividade frente à espécie *L. amazonensis*, principalmente sobre formas amastigotas, sem causar, no entanto, toxicidade à célula hospedeira do mamífero.

8 REFERÊNCIAS

ABREU, A.S. et al. Constituintes químicos do caule e das cascas do caule de *croton pullei* var. *glabrior* (euphorbiaceae). **Revista Virtual de Iniciação Acadêmica da UFPA**, v. 1, n. 2, p. 1-9, jul. 2001.

ADADE, C.M.; SOUTO-PADRÓN, T. Contributions of ultrastructural studies to the cell biology of trypanosomatids: targets for anti-parasitic drugs. **The Open Parasitology Journal**, Ontario, v. 4, p. 178-187, 2010.

ALBUQUERQUE, U.P (Org.). **Catálogo de plantas medicinais da Caatinga: Guia para ações de extensão**. São Paulo: Canal6, 2010b. 68 p.

ALBUQUERQUE, U.P. (Org.) **Caatinga: Biodiversidade e qualidade de vida**. São Paulo: Canal6, 2010a. 120 p.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **Plos One**, San Francisco, v. 7, n. 5, p. 1-12, May 2012.

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. Leishmaniasis and poverty. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 22, n. 12, p. 552-557, 2006.

AMARAL, J.F. **Atividade anti-inflamatória, antinociceptiva e gastroprotetora do óleo essencial de *Croton soderianus* Muell. Arg.** 2004. 151p. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) - Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 2004.

AMATO, V.S. et al. Use of itraconazole in the treatment of mucocutaneous leishmaniasis: a pilot study. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 4, n. 3, p. 153-157, 2000.

AMATO, V.S.; ANDRADE JÚNIOR, H.F.; DUARTE, M.I.S. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment. **Acta Tropica**, Basel, v. 85, n. 1, p. 39-49, 2003.

AMATO, VS. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana. **Boletim Epidemiológico Paulista** (Online), v. 26, p. 2-6, 2006. Disponível em: http://www.cve.saude.sp.gov.br/agencia/bepa26_lta.htm. Acesso em: 16 jun. 2014.

ANGÉLICO, E.C. **Avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante de *croton heliotropiifolius* Kuntze e *croton blanchetianus* Baill.** 2011. 87 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2011.

ANTONELLI, L.R.V. et al. Antigen specific correlations of cellular immune responses in human leishmaniasis suggests mechanisms for immunoregulation. **Clinical and Experimental Immunology**, London, v. 136, n. 2, p. 341-348, 2004.

ARAÚJO, C.C.A.; ALEGRIO, L.V.; LEON, L.L. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. **Phytochemistry**, New York, v. 49, n. 3, p. 751-754, Oct. 1998.

BALESTIERI, F.M. et al. *Leishmania (L.) amazonensis*-induced inhibition of nitric oxide synthesis in host macrophages. **Microbes and Infection**, Paris, v.4, p. 23-29, 2002.

BARBOSA, I.R. Epidemiologia da leishmaniose visceral no estado do Rio Grande do Norte, Brasil. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, Santa Catarina, v. 3, n. 1, p. 17-21, 2013.

BARBOSA, M.G.V. et al. Fauna de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) em um foco de leishmaniose tegumentar americana na área periurbana de Manaus, Estado do Amazonas. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 41, n. 5, p. 485-491, set-out. 2008.

BASSELIN, M. et al. Resistance to pentamidine in *Leishmania mexicana* involves exclusion of the drug from the mitochondrion. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 46, n. 12, p. 3731-3738, Dec. 2002.

BASTOS, V.D. Laboratórios farmacêuticos oficiais e doenças negligenciadas: perspectivas de política pública. **Revista do BNDES**, Rio de Janeiro, v. 13, n. 25, p. 269-298, jun. 2006.

BERMAN, J.D. Human leishmaniasis: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 24, n. 4, p. 684-703, Apr. 1997.

BEZERRA, J.L. et al. Avaliação da atividade leishmanicida in vitro de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.16, p. 631-637, dez. 2006.

BLACKWELL, J.M. et al. Genetics and visceral leishmaniasis: of mice and man. **Parasite Immunology**, Oxford, v. 31, n. 5, p. 254-266, May 2009.

BOMFIM, G. et al. Variation of cytokine patterns related to therapeutic response in diffuse cutaneous leishmaniasis. **Experimental Parasitology**, New York, v. 84, n. 2, p. 188-194, 1996.

BRAGA, F.G. et al. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 11, n. 2, p. 396-402, 2007.

BRASIL. Decreto nº 5.813, de 22 de junho de 2006. Aprova a Política Nacional de Plantas Mediciniais e Fitoterápicos e dá outras providências. **Diário Oficial**, Brasília, DF, 22 jun. 2006. Seção 1, p. 1.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Guia de vigilância epidemiológica**. 7. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2009.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Brasília: Ministério da Saúde, 2013.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. **Doenças infecciosas e parasitárias: guia de bolso**. 8.ed. Brasília : Ministério da Saúde, 2010a.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2.ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2010b.

_____. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Sistema nacional de vigilância em saúde: relatório de situação: Sergipe**. 5.ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2011.

BRITO, A.M.G. et al. Plants with anti-*Leishmania* activity: integrative review from 2000 to 2011. *Revista Brasileira de Farmacognosia*, São Paulo, v.7, n. 13, p. 34-41, jan-jun. 2013.

BRYCESON, A. A policy for leishmaniasis with respect to the prevention and control of drug resistance. **Tropical Medicine and International Health**, Oxford, v. 6, n. 11, p. 928-934, Nov. 2001.

CARVALHO, E.M. Parasite, vectors and reservoirs as determinants of tegumentary leishmaniasis. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 45, n. 4, p. 423-424, Jul-Aug. 2012.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.cdc.gov/ncidod/dpd/parasites/leishmania/>>. Acesso em 03 jun. 2014.

CELINE, V. et al. Medicinal plants from the Yanesha (Peru): Evaluation of the leishmanicidal and antimalarial activity of selected extracts. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 123, n. 3, p. 413-422, 2009.

CELLA, W. et al. Seventeen years of american cutaneous leishmaniasis in a Southern Brazilian municipality. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 54, n. 4, p. 215-218, Jul-Aug. 2012.

CHAPPUIS, F. et al. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?. **Nature Reviews Microbiology**, London, v. 5, n. 11, p. 873-882, Nov. 2007.

CLAUDINO, V.D. et al. Drimanes from *Drimys brasiliensis* with leishmanicidal and antimalarial activity. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 108, n. 2, p. 140-144, Apr. 2013.

COLLIN, N. et al. Sand fly salivary proteins induce strong cellular immunity in a natural reservoir of visceral leishmaniasis with adverse consequences for *Leishmania*. **PLoS Pathogens**, San Francisco, v. 5, n. 5, p. 1-11, May 2009.

COSSOLOSSO, D. S. **Atividades leishmanicida e antioxidante dos óleos essenciais de plantas encontradas no nordeste brasileiro**. 2013. 93 p. Dissertação (Mestrado em Ciências Veterinárias) - Faculdade de Veterinária, Universidade Estadual do Ceará, Fortaleza, 2013.

COSTA, I.S. **Ação da molécula doadora de ácido nítrico S-Nitrosoglutathione (GSNO) na leishmaniose cutânea experimental**. 2007. Dissertação (Mestrado em Ciências) - Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2007.

COSTA, J.F. **Aspectos imunopatogênicos da leishmaniose cutânea difusa: fatores da *Leishmania* e do hospedeiro**. 2013. 105 p. Tese de Doutorado (Pós-graduação em Patologia Humana) – Faculdade de Medicina, Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2013.

COSTA, J.M.L. Epidemiologia das leishmanioses no Brasil. **Gazeta Médica da Bahia**, Bahia, v. 75, n. 1, p. 3-17, jan-jun. 2005.

CROFT, S.L.; SEIFERT, K.; YARDLEY, V. Current scenario of drug development for leishmaniasis. **Indian Journal of Medical Research**, New Delhi, v. 123, n. 3, p. 399-410, Mar. 2006.

CROFT, S.L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A.H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 19, n. 1, p. 111-126, Jan. 2006.

CRUZ, E.M. et al. Leishmanicidal activity of *Cecropia pachystachya* flavonoids: arginase inhibition and altered mitochondrial DNA arrangement. **Phytochemistry**, New York, v. 89, p. 71-77, 2013.

CUNNINGHAM, A.C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**, New York, v. 72, n. 2, p. 132-141, 2002.

DANTAS-TORRES, F. The role of dogs as reservoirs of *Leishmania* parasites, with emphasis on *Leishmania (Leishmania) infantum* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Veterinary Parasitology**, Amsterdam, v. 149, n. 3-4, p. 139-146, 2007.

DANTAS-TORRES, F.; BRANDÃO-FILHO, S. P. Expansão geográfica da leishmaniose visceral no Estado de Pernambuco. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, Brasília, v. 39, n. 4, p. 352-356, jul-ago. 2006.

DEMICHELI, C. et al. Antimony(V) complex formation with adenine nucleosides in aqueous solution. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1570, n. 3, p. 192-198, 2002.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comparative Immunology, Microbiology and Infectious Diseases**, Oxford, v. 27, n. 5, p. 305-318, 2004.

DEY, S. et al. High level arsenite resistance in *Leishmania tarentolae* is mediated by an active extrusion system. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v.67, n. 1, p. 49-57, 1994.

DYE, C.; WILLIAMS, B.G. Malnutrition, age and the risk of parasitic disease: visceral leishmaniasis revisited. **The Royal Society**, London, v. 254, n. 1339, p. 33-39, Oct. 1993.

ESCH, K.J.; PETERSEN, C.A. Transmission and epidemiology of zoonotic protozoal diseases of companion animals. **Clinical Microbiology Reviews**, Washington, v. 26, n. 1, p. 58-85, Jan. 2013.

FEIJÓ, A.M. et al. Plantas medicinais utilizadas por idosos com diagnóstico de *Diabetes mellitus* no tratamento dos sintomas da doença. **Revista Brasileira de Plantas Medicinais**, Botucatu, v.14, n.1, p.50-56, 2012.

FIGUEREDO, F.G. et al. Avaliação das potenciais atividades tripanocida e antileishmania do extrato de folhas de *Piper arboreum* (Piperaceae) e de suas frações. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, Araraquara, v. 35, n. 1, p. 149-154, 2014.

FONSECA-SILVA, F. et al. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. **Plos One**, San Francisco, v. 6, n. 2, p. 14666- 14672, 2011.

FRÉZARD, F. et al. Glutathione-induced conversion of pentavalent antimony to trivalent antimony in meglumine antimoniate. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 45, n. 3, p. 913-916, Mar. 2001.

GIL, E.S. et al. Leishmaníase: arsenal terapêutico e alvos moleculares. **Vita et Sanitas**, Goiás, v. 1, n. 1, 2007.

GOES, M.A.O.; JERALDO, V.L.S. Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes internados com leishmaniose visceral em hospital de referência. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, São Paulo, v. 11, n. 3, p. 227-231, jul-set. 2013.

GOES, M.A.O.; MELO, C.M.; JERALDO, V.L.S. Série temporal da leishmaniose visceral em Aracaju, estado de Sergipe, Brasil (1999 a 2008): aspectos humanos e caninos. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, São Paulo, v. 15, n. 2, p. 298-307, 2012.

GONÇALVES, A.L. **Estudo da atividade antimicrobiana de algumas árvores medicinais nativas com potencial de conservação/recuperação de florestas tropicais**. 2007. 211 p. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas) – Instituto de Biociências do Campus de Rio Claro, Universidade Estadual Paulista, Rio Claro, 2007.

GOSSAGE, S.M.; ROGERS, M.E.; BATES, P.A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 33, n. 10, p.1027-1034, Sept. 2003.

GOURBAL, B. et al. Membrane transport, structure, function and biogenesis : drug uptake and modulation of drug resistance in *Leishmania* by an aquaglyceroporin. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 30, p. 31010-31017, July 2004.

GOVAERTS, R.; FRODIN, D. G.; RADCLIFFE-SMITH, A. **World checklist and bibliography of Euphorbiaceae**. Kew: Royal Botanic Gardens. 2000. 1621 p.

GRAMICCIA, M.; GRADONI, L. The current status of zoonotic leishmaniases and approaches to disease control. **International Journal for Parasitology**, New York, v. 35, n. 11-12, p. 1169-1180, 2005.

GREEN, L.C. et al. Analyses of nitrate, nitrite and [¹⁵N]nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, New York, v.126, p. 131-138, 1982.

GUIMARÃES, R.L.V. et al. Activity of the julocrotine, a glutarimide alkaloid from *Croton pullei* var. *glabrior*, on *Leishmania (L.) amazonensis*. **Parasitology Research**, Berlin, v. 107, n. 5, p. 1075-1081, 2010.

HANDMAN, E.; BULLEN, D.V.R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. **Trends in Parasitology**, Oxford, v. 18, n. 8, p. 332-334, Aug. 2002.

HERWALDT, B.L. Leishmaniasis. **Lancet**, Minneapolis, v. 354, n. 9185, p. 1191-1199, 1999.

HPMED. Horto de Plantas Mediciniais. **Universidade Federal de Alfenas**. Disponível em: <<http://www.unifal-mg.edu.br/hpmed/files/RENISUS.pdf>>. Acesso em: 10 jun. 2014.

JHINGRAN, A. et al. Paromomycin : uptake and resistance in *Leishmania donovani*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, Amsterdam, v. 164, p. 111-117, 2009.

INACIO, J.D.F.; CANTO-CAVALHEIRO, M.M.; ALMEIDA-AMARAL, E.E. In Vitro and in Vivo Effects of (-)-Epigallocatechin 3-O-gallate on *Leishmania amazonensis*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 76, p. 1993-1996, 2014.

KAPPAGODA, S.; LOANNIDIS, J.P. Prevention and control of neglected tropical diseases: overview of randomized trials, systematic reviews and meta-analyses. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneve, v. 92, n.5, p. 356-366, May 2014.

KARP, C.L. et al. In vivo cytokine profiles in patients with kala-azar: marked elevation of both interleukin-10 and interferon gamma. **The Journal of Clinical Investigation**, Durham, v. 91, n. 1, p. 1644-1648, Apr. 1993.

KILLICK-KENDRICK, R. Phlebotomine vectors of the leishmaniasis: a review. **Medical and Veterinary Entomology**, Oxford, v. 4, n. 1, p. 1-24, 1990.

LAINSON, R. et al. American visceral leishmaniasis: on the origin of *Leishmania (Leishmania) chagasi*. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 81, n. 3, p. 517, 1987.

LAINSON, R. The Neotropical *Leishmania* species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, Pará, v.1, n. 2, p. 13-32, 2010.

LAINSON, R.; SHAW, J.J. The role of animals in the epidemiology of South American leishmaniasis. *In*: LUMSDEN, W.H.R, EVANS, D.A (Ed.). **Biology of the Kinetoplastida**. London: Academic Press, 1979. p. 1-116.

LIMA, G.S de. **Estudo da atividade tripanossomicida e leishmanicida de extratos, frações e terpenos de *Croton cajucara* benth.** 2014. 75 p. Tese (Doutorado em Ciência, Tecnologia e Inovação em Agropecuária) - Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2014.

LINDHOLZ, C.G. **Identificação e caracterização das espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae), infectados por *Leishmania* spp. no município de São Borja, Rio Grande do Sul, Brasil.** 2012. 42 p. Monografia (Graduação em Ciências Biológicas) - Faculdade de Biociências, Universidade Católica, Rio Grande do Sul, 2012.

LOPES, A.H. et al. Trypanosomatids : odd organisms, devastating diseases. **The Open Parasitology Journal**, Ontario, v. 4, n. 1, p. 30-59, 2010.

MAIA, C. et al. Experimental transmission of *Leishmania infantum* by two major vectors: a comparison between a viscerotropic and a dermatropic strain. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 5, n. 6, p. 1-6, June 2011.

MANDAL, G. et al. Increased levels of thiols protect antimony unresponsive *Leishmania donovani* field isolates against reactive oxygen species generated by trivalent antimony. **Parasitology**, London, v. 134, n. 12, p. 1679-1687, 2007.

MARÍN, C. et al. Antileishmaniasis activity of flavonoids from *Consolida oliveriana*. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 72, n. 6, p. 1069–1074, 2009.

MARLETTA, M.A. Nitric oxide synthase: aspects concerning structure and catalysis. **Cell**, Cambridge, v.78, n. 6, p.927-930, 1994.

MARTINS-MELO, F.R. et al. Mortality and case fatality due to visceral leishmaniasis in Brazil: a nationwide analysis of epidemiology, trends and spatial patterns. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 4, p. 1-14, Apr. 2014.

MAURÍCIO, I.L.; STOTHARD, J.R.; MILES, M.A. The strange case of *Leishmania chagasi*. **Parasitology Today**, Cambridge, v. 16, n. 5, p. 188-189, 2000.

MCCALL, L.I.; ZHANG, W.W.; MATLASHEWSKI. Determinants for the development of visceral leishmaniasis disease. **Plos Pathogens**, San Francisco, v. 9, n. 1, p. 1-7, Jan. 2013.

MCCHESENEY, J.D.; CLARCK, A.M.; SILVEIRA, E.R. Antimicrobial diterpenes of *Croton sonderianus*, 1. Hardwickic and 3,4-secotrachylobanoic acids. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 54, n. 6, p. 1625-1633, 1991.

MELO, G.F.A. **Estudo da composição química e da atividade antibacteriana in vitro e em alimento do óleo essencial de *Croton blanchetianus* Baill.** 2011. 96 p. Dissertação (Mestrado em Ciência e Tecnologia de Alimentos) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2011.

MELO, G.F.A. et al. The sensitivity of bacterial foodborne pathogens to *Croton blanchetianus* Baill essential oil. **Brazilian Journal of Microbiology**, São Paulo, v. 44, n. 4, p. 1189-1194, 2013.

MICHELETTI, A.C.; BEATRIZ, A. Progressos recentes na pesquisa de compostos orgânicos com potencial atividade leishmanicida. **Revista Virtual de Química**, v. 4, n. 3, p. 268-286, mai-jun. 2012.

MITTRA, B. et al. Luteolin, an abundant dietary component is a potent antileishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. **Molecular Medicine**, Cambridge, v. 6, p. 527-541, 2000.

MOHAPATRA, S. Drug resistance in leishmaniasis: Newer developments. **Tropical Parasitology**, Mumbai, v. 4, n. 1, p. 1-9, Jan. 2014.

MOLINA, I. et al. Efficacy of liposomal amphotericin B for secondary prophylaxis of visceral leishmaniasis in HIV-infected patients. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, London, v. 60, n. 4, p. 837-842, 2007.

MONGE-MAILO, B.; LÓPEZ-VÉLEZ, R. Therapeutic options for old world cutaneous leishmaniasis and new world cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Drugs**, New York, v. 73, n. 17, p. 1889-1920, Oct. 2013.

MORAIS, S.M. et al. Larvicidal activity of essential oils from Brazilian *Croton* species against *Aedes aegypti*. **Journal of the American Mosquito Control Association**, Fresno CA, v. 22, n.1, p. 161-164, 2006.

NAVIN, T.R. et al. Placebo-controlled clinical trial of sodium stibogluconate (Pentostam) versus ketoconazole for treating cutaneous leishmaniasis in Guatemala. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 165, p.528-534, 1992.

NEVES, D. P. (Ed.) **Parasitologia humana**. 11. ed. São Paulo: Atheneu, 2010. 494p.

OLIVEIRA, V.C.S. et al. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. **Parasitology Research**, Berlin, v.104, p. 1053-1059, 2009.

OLLIARO, P.L. et al. Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980-2004. **Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 5, n. 12, p. 763-774, Dec. 2005.

OSTRAKHOVITCH, E.A.; AFANAS'EV, I.B. Oxidative stress in rheumatoid arthritis leukocytes: suppression by rutin and other antioxidants and chelators. **Biochemical Pharmacology**, Oxford, v. 62, n. 6, p. 743-746, 2001.

PAES-GONÇALVES, H. et al. The leishmanicidal activity of a cyclopentenedione derivative isolated from the roots of a native Amazonian pepper (*Piper carniconnectivum*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 22, n. 5, p. 1018-1023, Set-Oct. 2012.

PALMEIRA-JÚNIOR, S.F. et al. Constituintes químicos das folhas e caule de *Croton sellowii* (Euphorbiaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 16, n.3, p. 397-402, jul-set. 2006.

PAVLI, A.; MALTEZOU, H.C. Leishmaniasis, an emerging infection in travelers. **International Journal of Infectious Diseases**, Hamilton, v. 14, n. 12, p. 1032-1039, 2010.

PELISSARI, D.M. et al. Tratamento da leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 20, n. 1, p. 107-110, 2011.

PIOVESAN, A. **Epidemiologia da leishmaniose tegumentar americana (LTA) no estado do Mato Grosso do Sul no período de 2001 a 2010**. 2012. 110 p. Dissertação (Mestrado em Vigilância em Saúde nas Fronteiras) – Escola Nacional de Saúde Pública - ENSP, Dourados, 2012.

PURKAIT, B. et al. Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v. 56, n. 2, p. 1031-1041, 2012.

RABELO, A.; ORSINI, M.; DISCH, J. Leishmania/HIV co-infection in Brazil: an appraisal. **Annals of Tropical Medicine and Parasitology**, Liverpool, v. 97, n. 1, p. 17-28, 2003.

RAMÍREZ-MACÍAZ, I. et al. Leishmanicidal activity of nine novel flavonoids from *Delphinium staphisagria*. **The Scientific World Journal**, Cairo, v. 2012, p. 1-10, 2012.

RATH, S. et al. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, São Paulo, v. 26, n. 4, p. 550-555, 2003.

RAYCHAUDHURY, B. et al. Antiparasitic activity of a triphenyl tin complex against *Leishmania donovani*. **Acta tropica**, Basel, v. 95, n. 1, p. 1-8, 2005.

READY, P. Biology of phlebotomine sand flies as vectors of disease agents. **Annual Review of Entomology**, Palo Alto, v. 58, p. 227-250, 2013.

READY, P. Epidemiology of visceral leishmaniasis. **Clinical Epidemiology**, Oxford, v. 6, p. 147-154, May 2014.

REIS, L.C. et al. Mecanismos imunológicos na resposta celular e humoral na leishmaniose tegumentar americana. **Revista de Patologia Tropical**, Goiânia, v. 35, n. 2, p. 103-115, mai-ago. 2006.

REIS, R.S. et al. Ocorrência de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) no ambiente peridomiciliar em área de foco de transmissão de leishmaniose tegumentar no município de Manaus, Amazonas. **Acta Amazônica**, Manaus, v. 43, n. 1, p. 121-124, 2013.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. **Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 7, p. 581-596, Sept. 2007.

REVEIZ, L. et al. Interventions for american cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: a systematic review update. **Plos One**, San Francisco, v. 8, n. 4, p. 1-14, Apr. 2013.

RIBEIRO, M. D. **Diagnóstico ambiental em saúde: ecoepidemiologia da leishmaniose tegumentar americana no estado do Acre**. 2013. 72 p. Dissertação (Mestrado em Promoção de Saúde) – Universidade de França, França, 2013.

RIBEIRO, T.G. et al. Antileishmanial activity and cytotoxicity of Brazilian plants. **Experimental Parasitology**, New York, v. 143, p. 1-9, May 2014.

ROCHA, L.G. et al. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, Stuttgart, v. 12, n. 6-7, p. 514-535, 2005.

ROHOUSOVÁ, I. et al. Salivary gland transcriptomes and proteomes of *Phlebotomus tobbi* and *Phlebotomus sergenti*, vectors of leishmaniasis. **Plos Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 5, p. 1-27, May 2012.

ROSA, M.S.S. et al. Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, Washington, v.47, n. 6, p. 1895-1901, June 2003.

SALATINO, A.; SALATINO, M.L.F.; NEGRI, G. Traditional uses , chemistry and pharmacology of *Croton* species (Euphorbiaceae). **Journal of the Brazilian Chemical Society**, São Paulo, v. 18, n. 1, p. 11-33, 2007.

SANTANA, V.S. **Estudo comparativo de óleos essenciais de espécies de *Croton* do estado de Sergipe**. 2011. 96 p. Dissertação (Mestrado em Química) - Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2011.

SANTOS, M.L.B. **Caracterização fenotípica de isolados de *Leishmania Chagasi* naturalmente resistentes ao antimonial**. 2013. 59 p. Dissertação (Mestrado em Biologia Parasitária) – Universidade Federal de Sergipe, São Cristóvão, 2013.

SEIFERT, K. et al. Characterization of *Leishmania donovani* promastigotes resistant to hexadecylphosphocholine (miltefosine). **International Journal of Antimicrobial Agents**, Amsterdam, v. 22, n. 4, p. 380-387, Oct. 2003.

SHARMA, U.; SINGH, S. Insect vectors of *Leishmania*: distribution, physiology and their control. **Journal of Vector Borne Diseases**, Delhi, v. 45, n. 4, p. 255-272, Dec. 2008.

SILVA, A.A.S. et al. Estudo fitoquímico e atividades biológicas do limãozinho *Zanthoxylum syncarpum* Tull. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, Ceará, v. 8, n. 2, p. 37-53, jan-mar. 2014.

SILVA, J.S. et al. Sinopse das espécies de *Croton* L. (Euphorbiaceae) no estado de Pernambuco, Brasil. **Acta Botânica Brasílica**, São Paulo, v. 24, n. 2, p. 441-453, 2010.

SILVA, N. C.C. **Estudo comparativo da ação antimicrobiana de extratos e óleos essenciais de plantas medicinais e sinergismo com drogas antimicrobianas**. 2010. 75p. Dissertação (Mestrado em Biologia Geral e Aplicada) - Instituto de Biociências, Universidade Estadual Paulista, Botucatu, 2010.

SILVA, R.R.P. **Atividade leishmanicida do extrato da raiz de *Physalis angulata* e sua ação na célula hospedeira**. 2013.106 p. Dissertação (mestrado em Neurociências e Biologia Celular) - Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Belém, 2013.

SILVEIRA, E.R. **Contribuição ao conhecimento químico de plantas nativas do Nordeste – *Croton sonderianus* Muell. Arg. 1979**. Tese (Química Orgânica) - Universidade Federal do Ceará, Fortaleza, 1979. *Apud* ANGÉLICO, E.C. **Avaliação das atividades antibacteriana e antioxidante de *croton heliotropiifolius* Kuntze e *croton blanchetianus* Baill.** 2011. 87 p. Dissertação (Mestrado em Zootecnia) - Universidade Federal de Campina Grande, Patos, 2011.

SIMÕES, C.M.O.; SCHENKEL, E.P. A pesquisa e a produção brasileira de medicamentos a partir de plantas medicinais: a necessária interação da indústria

com a academia. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v.12, n. 1, p. 35-40, 2002.

SINGH, N. et al. Natural product based leads to fight against leishmaniasis. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, Oxford, v. 22, n. 1, p. 18-45, 2014.

SINGH, N.; KUMAR, M.; SINGH, R. Leishmaniasis: current status of available drugs and new potential drug targets. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 5, n. 6, p. 485-497, 2012.

SIQUEIRA, F.F.S. **Potencial de extratos aquosos de plantas da caatinga sobre o ácaro verde da mandioca *mononychellus tanajoa* bondar (acarí: tetranychidae)**. 2013. 36 p. Dissertação (Mestrado em Produção Vegetal) - Universidade Federal Rural de Pernambuco, Serra Talhada, 2013.

SOARES-BEZERRA, R.J.; LEON, L.; GENESTRA, M. Recentes avanços da quimioterapia das leishmanioses: moléculas intracelulares como alvo de fármacos. **Revista Brasileira de Ciências Farmacêuticas**, São Paulo, v. 40, n. 2, p. 139-148, abr-jun. 2004.

SOUZA-MOREIRA, T.M.; SALGADO, H.R.N.; PIETRO, R.C.L.R. O Brasil no contexto de controle de qualidade de plantas medicinais. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, São Paulo, v. 20, n. 3, p. 435-440, jun-jul. 2010.

SUNDAR, S. et al. Short-course of oral miltefosine for treatment of visceral leishmaniasis. **Clinical Infectious Diseases**, Chicago, v. 31, n. 4, p. 1110-1103, Oct. 2000.

TAVARES, L.M.S.A.; TAVARES, E.D. Incidência, distribuição geográfica e aspectos ambientais das áreas endêmicas da leishmaniose visceral em Sergipe. **Informe Epidemiológico do SUS**, Brasília, v.8, n.1, p.47-52, jan-mar. 1999.

VIEIRA, M.G.S. et al. B-cell infiltration and frequency of cytokine producing cells differ between localized and disseminated human cutaneous leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 97, n. 7, p. 979-983, Oct. 2002.

WENIGER, B. et al. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 78, n. 2-3, p. 193-200, 2001.

WERNECK, G.L. et al. The urban spread clues from of visceral spatial leishmaniasis: analysis. **Epidemiology**, Baltimore, v. 13, n. 3, p. 364-367, May 2002.

WHEELER, R.J.; GLUENZ, E.; GULL, K. The cell cycle of *Leishmania*: morphogenetic events and their implications for parasite biology. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 79, n. 3, p. 647-662, 2011.

WHO. World Health Organization. **Control of the leishmanises**: Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva: World Health Organization, 2010.

_____. World Health Organization. **Status of endemicity of cutaneous leishmaniasis, worldwide, 2012.** Disponível em: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_CL_2013.png> Acesso em: 10 jun. 2014a.

_____. World Health Organization. **Status of endemicity of visceral leishmaniasis, worldwide, 2012.** Disponível em: <http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_VL_2013.png> Acesso em: 10 jun. 2014b.