



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA

CENTRO DE BIOTECNOLOGIA

GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

PÂMELA GABRIELLA RODRIGUES DAS NEVES

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA QUERCETINA
COMO POTENCIAL AGENTE ANTI-
*LEISHMANIA***

JOÃO PESSOA – PB

2016

PÂMELA GABRIELLA RODRIGUES DAS NEVES

**AVALIAÇÃO *IN VITRO* DA QUERCETINA
COMO POTENCIAL AGENTE ANTI-
*LEISHMANIA***

Trabalho de conclusão de curso
submetido à Universidade Federal da
Paraíba como parte dos requisitos
necessários para a obtenção do Grau de
Bacharel em Biotecnologia.

Orientadora:

Prof^a.Dra.Tatjana Keesen de Souza Lima

JOÃO PESSOA – PB

2016

N518a Neves, Pâmela Gabriella Rodrigues das.
Avaliação *in vitro* da quercetina como potencial agente
anti-leishmania / Pâmela Gabriella Rodrigues das Neves.-
João Pessoa, 2016.
70f. : il.
Orientadora: Tatjana Keesen de Souza Lima
Trabalho de Conclusão de Curso - TCC
(Graduação) - UFPB/CB
1. Biotecnologia. 2. Leishmaniose. 3. Tratamento.

UFPB/BC

CDU: 60(043.2)

ATA DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA (UFPB)
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA (CBiotec)
CAMPUS I – JOÃO PESSOA/PB
Coordenação do Curso de Bacharelado em
Biotecnologia



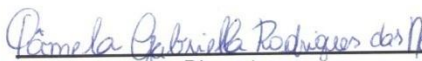
João Pessoa, 10 de junho de 2016.

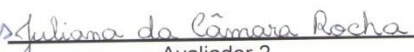
ATA DE DEFESA PÚBLICA DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO

Aos dez dias do mês de junho de 2016, às 10:00 h, em sessão pública no auditório do Instituto de Pesquisa em Fármacos e Medicamentos (IPeFarM) deste Campus Universitário, na presença da Banca Examinadora presidida pela Professora Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente e composta pelos avaliadores 1. Prof. Dr. Ulrich Vasconcelos da Rocha Gomes; 2. Ms. Juliana da Câmara Rocha (Doutoranda do PgPNSB/UFPB), a aluna **Pâmela Gabriella Rodrigues das Neves**, matrícula 11212933, apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso intitulado: **Avaliação *in vitro* da quercetina como potencial agente anti-Leishmania**, como requisito curricular indispensável para a integralização do Curso de Graduação em Biotecnologia. Após reunião em sessão reservada, a Banca Examinadora deliberou e decidiu pela **APROVAÇÃO** do referido trabalho, divulgando o resultado formalmente ao aluno e demais presentes e eu, Tatjana Keesen de Souza Lima Clemente, na qualidade de Presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais avaliadores e pela discente.


Presidente da Banca Examinadora


Avaliador 1


Discente


Avaliador 2

João Pessoa/PB, 10 de junho de 2016.

*“ O temor ao Senhor é a instrução da sabedoria e diante da honra vai a
humildade”.*

Provérbios 15:33

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus por todas as bênçãos concedidas a mim ao decorrer desses anos, por ter me dado bom ânimo, sabedoria, discernimento em minhas decisões, coragem e força que me fizeram alcançar e realizar um dos meus ideais, sem Deus eu nada sou e para Ele o meu maior agradecimento.

Aos meus pais Alexandre Rodrigues e Josenilda Ramos e aos meus irmãos Poliana Ramos, Pedro Gabriel e Alexandre Filho pelo incentivo e por sempre acreditarem em mim, vocês são os meus maiores exemplos de perseverança. Sem o apoio de vocês essa conquista não seria possível.

Aos meus familiares e amigos que sempre me apoiaram de alguma maneira e procuraram me ajudar de alguma forma para que hoje eu pudesse concluir mais essa etapa da minha vida.

À minha orientadora professora Dr^a Tatjana Keesen de Souza Lima, por todos esses anos de orientação, agradeço pela oportunidade de fazer parte do grupo de pesquisa do Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas, por compartilhar seus conhecimentos comigo, pela paciência, confiança, críticas, pelo incentivo a buscar conhecimento e a oportunidade de ser sua aluna de iniciação científica.

Aos meus colegas do Laboratório de Imunologia de Doenças Infecciosas, que me ajudaram no decorrer dos anos, pelos momentos compartilhados e pelas amizades conquistadas.

A todos os professores do Centro de Biotecnologia que compartilharam os seus conhecimentos comigo.

Enfim, a todos aqueles sem os quais a realização deste trabalho não teria sido possível, meu muito obrigada.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	11
2	FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	14
2.1	As espécies de <i>Leishmania</i>	14
2.2.1	Classificação	14
2.1.2	Estrutura	15
2.1.3	Ciclo de vida do parasita	16
2.2	A Leishmaniose	18
2.2.1	Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)	18
2.2.2	Aspectos epidemiológicos, clínicos e imunológicos	19
2.3	Tratamento das leishmanioses	22
2.3.1	Flavonoides	23
2.3.2	Possíveis benefícios dos flavonoides para a saúde	24
3.	OBJETIVOS	28
3.1	OBJETIVO GERAL	28
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	28
4.	MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1	Cultura de Parasitas	29
4.2	Droga	29
4.3	Determinação de atividade anti- <i>Leishmania</i>	29
4.3.1	Determinação de atividade anti- <i>Leishmania</i> pelo método do MTT	29
4.3.2	Atividade anti- <i>Leishmania</i> por microscopia óptica	30
4.4	Obtenção de leucócitos para ensaios biológicos	30
4.5	Marcação de <i>Leishmania amazonensis</i> com CFSE	31
4.6	Análise da influência da quercetina na taxa de infecção em monócitos	31
4.7	Determinação da citotoxicidade	32
4.8	Ensaio de lise de glóbulos vermelhos	32

4.9 Análises Estatísticas	33
5 RESULTADOS	34
5.1 Análise da atividade anti- <i>Leishmania</i> da quercetina, na viabilidade celular e inibição de crescimento nos tempos de 24, 48 e 72 horas.	34
5.2 Análise da influência da quercetina na taxa de infecção de monócitos por <i>L. amazonensis</i>	39
5.3 Determinação do perfil apoptótico e necrótico em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> causado pelo tratamento com a quercetina.....	42
5.4 Avaliação do ensaio de glóbulos vermelhos	45
6 DISCUSSÃO	47
7 CONCLUSÃO.....	51
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	52
9. ANEXOS	68

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Taxonomia do gênero <i>Leishmania</i> . Adaptado de Mishra <i>et al.</i> ,(2009).	15
Figura 2: Formas desenvolvidas do parasita <i>Leishmania spp.</i> promastigota (A) e amastigota (B).....	16
Figura 3: Ciclo de vida do parasita do gênero <i>Leishmania spp.</i>	18
Figura 4: Casos notificados de leishmaniose tegumentar americana, Brasil – 1980 a 2010...	19
Figura 5: Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar.....	20
Figura 6: Manifestações clínicas da Leishmaniose Disseminada..	21
Figura 7: (A) Estrutura básica dos flavonoides e (B) Estrutura básica dos flavonoides com grupo carbonila C-4.....	25
Figura 8: Estrutura química da quercetina	26
Figura 9: Porcentagem média de viabilidade celular de formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> na presença de diferentes concentrações da quercetina,24h.	34
Figura 10: Porcentagem média de viabilidade celular de formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> na presença de diferentes concentrações da quercetina,48h.	35
Figura 11: Porcentagem média de viabilidade celular de formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> na presença de diferentes concentrações da quercetina,72h.	36
Figura 12: Porcentagem média de crescimento de formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> na presença de diferentes concentrações da quercetina após 24, 48 e 72h.	37
Figura 13: Porcentagem média de crescimento de formas promastigotas de <i>Leishmania amazonensis</i> na presença de diferentes concentrações da quercetina.	38
Figura 14: Perfil da distribuição de células do sangue total infectadas com <i>L. amazonensis</i> no gráfico de tamanho x granulidade.....	40
Figura 15: Taxa de infecção da <i>L. amazonensis</i> nos monócitos, nas células do sangue total sem o tratamento, com a anfotericina B ou com a quercetina.	41
Figura 16: <i>L. amazonensis</i> tratadas ou não com a quercetina, nem com a anfotericina B.	44

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Resultado do IC ₅₀ da atividade anti- <i>Leishmania</i> da quercetina.....	37
Tabela 2: Análise de morte celular de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratados e não tratados com a quercetina e o medicamento de referência, Anfotericina B por citometria de fluxo.. ..	44
Tabela 3: Efeito citotóxico da quercetina e da Anfotericina B em células vermelhas de humanos.....	45

RESUMO

A leishmaniose é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, endêmica nas zonas tropicais, que afeta mais de 12 milhões de pessoas em todo mundo e apresenta alta endemicidade, morbidade e mortalidade em populações da África, Ásia e América Latina. No Brasil ocorre em todo o território, tanto a Leishmaniose Visceral (LV) como a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), as quais apresentam maior índice endêmico nas regiões Norte e Nordeste, devido principalmente às características econômicas e culturais das populações que habitam essas regiões, predominando principalmente nos estados da Bahia, Ceará, Piauí e Maranhão. O tratamento das leishmanioses atualmente é feito à base de antimoniais pentavalentes, Anfotericina B e pentamidinas, as quais são tóxicas, de custo elevado, difícil administração e podem causar resistência ao parasita. Considerando as dificuldades de tratamento e a ausência de vacinas, há urgência na busca de novas drogas terapêuticas dentre as quais se incluem os fitoterápicos. Estudos recentes mostraram que a quercetina induz uma alteração no potencial de membrana de formas promastigotas de *L. amazonensis*. Tomando como base estudos anteriores que abordavam o mecanismo de ação da quercetina na leishmaniose esse projeto teve como objetivo avaliar a atividade leishmanicida da quercetina na *L. amazonensis*. Os resultados observados nesse trabalho mostraram que o flavonoide quercetina possui atividade anti-*Leishmania*. Contudo, o Glucantime® obteve uma eficácia superior na porcentagem de inibição do crescimento parasitário. Foi avaliado também a citotoxicidade da quercetina em comparação com Anfotericina B e observou-se que a quercetina é um composto biologicamente ativo na espécie *L. amazonensis*. No entanto, quando foi analisado se o tratamento com a quercetina e a Anfotericina B influenciavam na taxa de infecção de monócitos pelo parasita, viu-se que a quercetina diminuiu a taxa de infecção causada pelos parasitas, comparada a anfotericina B. Dessa forma, sugerimos que apesar da quercetina apresentar um potencial inibitório de crescimento da *L. amazonensis* menor do que os medicamentos de referências utilizados atualmente, ela possui um excelente potencial no que diz respeito à diminuição da taxa de infecção da *Leishmania* no monócito. Esse mecanismo precisa ser explorado por meio de estudos das vias de infecção, para nos conduzir há maiores esclarecimentos sobre a ação da quercetina como possível facilitador do tratamento da doença.

Palavras-chave: Leishmaniose; tratamento; quercetina.

ABSTRACT

Leishmaniasis is an infectious disease caused by protozoa of the genus *Leishmania* affecting 12 million worldwide. These diseases are localized mainly in tropical areas of the world and present high endemicity, morbidity and mortality in populations of Africa, Asia and Latin America. In Brazil it occurs throughout the territory, both the visceral Leishmaniasis (VL) as the American Tegumentary Leishmaniasis (ATL), which has the most endemicity in the North and Northeast of Brazil, due mainly to economic and cultural characteristics of the population that inhabit these regions. In Northeast of Brazil occur principally in the States of Bahia, Ceará, Piauí and Maranhão. Treatment of leishmaniosis currently has been done based on pentavalent antimonies, amphotericin B and pentamidas, which are toxic, expensive and can cause parasite resistance. Considering the difficulties of treatment and vaccines making, there is urgency in the search for new therapeutic drugs and phytotherapy emerge as a potent tool against the parasites. Recent studies have shown that quercetin induces a change in membrane potential of *L.amazonensis* amastigotes. Based on previous studies that addressed the mechanism of action of quercetin on leishmaniasis, this project aimed to evaluate the anti-*Leishmania* activity of quercetin in *L. amazonensis*. Our results showed that the flavonoid quercetin had anti-*Leishmania* activity even though of Glucantime® had present better effectiveness in the percentage of parasitic growth inhibition. Also, was evaluated the cytotoxicity of quercetin compared to Amphotericin B and was found that quercetin is a biologically active compound in the species *L. amazonensis*. Interestingly, when was analyzed the influence of the quercetin and amphotericin B to the rate of infection of monocytes, it has been seen that quercetin reduced the rate of infection caused by parasites, compared to amphotericin B. Thus, this study suggest that although quercetin did not have an excellent anti-*Leishmania* potential, it may be used as adjuvant in the treatment of *L. amazonensis* infection. However, it is recommended further studies of the mechanisms of infection to lead us to further clarification of the action of quercetin as a potential facilitator of the treatment of the disease.

Keywords: Leishmaniasis; treatment; quercetin.

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose é uma doença infecciosa, não contagiosa, causada por protozoários do gênero *Leishmania*, endêmica ao redor do mundo, que afeta mais de 12 milhões de pessoas e apresenta alta endemicidade, morbidade e mortalidade em populações da África, Ásia e América Latina (OMS, 2002, DUJARDIN, 2006). No Brasil, ocorre em todo o território, tanto a Leishmaniose Visceral (LV) como a Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), as quais são endêmicas nas regiões Norte e Nordeste, devido principalmente às características econômicas e culturais dessas populações, predominando principalmente nos estados da Bahia, Ceará, Piauí e Maranhão (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2000; RATH *et al.*, 2003).

O tratamento das leishmanioses é feito a base de antimoniais pentavalentes, anfotericina B e pentamidinas, os quais são tóxicos, de custo elevado, difícil administração e podem causar resistência ao parasita (RATH *et al.*, 2003; CROFT; COOMBS, 2003). Considerando as dificuldades de tratamento e a ausência de vacinas, há urgência na busca de novas drogas terapêuticas dentre as quais se incluem os fitoterápicos (CARVALHO; FERREIRA, 2001; NAKAMURA *et al.*, 2006). O tratamento da leishmaniose é baseado em antimoniais pentavalentes, medicamentos desenvolvidos há mais de 50 anos, que são tóxicos (CROFT S.L.; COOMBS G.H., 2003). De acordo com levantamento realizado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) em 2000, as espécies vegetais são a melhor e maior fonte de fármacos para humanidade. Estudos etnobotânicos têm demonstrado o uso popular de plantas no tratamento das leishmanioses tanto por via oral, como na aplicação tópica sobre as lesões cutâneas (FRANÇA *et al.*, 1993; MATHIAS; EMILY, 1993; SILVA *et al.*, 1995; MOREIRA *et al.*, 2002). Muitos vegetais apresentam em sua composição substâncias das classes dos alcalóides, terpenos, lignanas, chalconas, flavonoides e lactonas esquiterpênicas, compostos descritos na literatura como eficazes na atividade leishmanicida e/ou anti-*Leishmania* (IWU *et al.*, 1994 ; QUEIROZ *et al.*, 1996 ; TORRES-SANTOS, 1999 ; KAM *et al.*, 1999 ; ROCHA *et al.*, 2005).

Foram encontrados nos últimos 10 anos, dezenas de novos compostos potenciais naturais para o uso no combate da *Leishmania ssp.*, especialmente das florestas tropicais da América do Sul e África (CARVALHO, P. B.; FERREIRA., 2001). Os flavonoides com princípios ativos e seus análogos semisintéticos e sintéticos serviram como um importante caminho para novos compostos quimioterapêuticos. Além disso, obtiveram-

se muitos resultados relevantes a partir da busca de produtos naturais com a atividade anti-*Leishmania* e essas revelações deram um novo impulso para o desenvolvimento de compostos sintéticos valiosos, para o tratamento de indivíduos infectados com *Leishmania spp.*

Diversos compostos químicos, isolados de extratos vegetais, tem atividade leishmanicida comprovada sobre formas promastigotas e amastigotas *like* de *Leishmania spp.* em ensaios *in vitro*. Já foi relatada a atividade leishmanicida de terpenóides (SAUVAIN *et al.*, 1996), aminoglicosteroides e aminosteroides (KAM *et al.*, 1997), naftoquinonas (Fournet *et al.*, 1992; Kayser *et al.*, 2000), chalconas (Chen *et al.*, 1993; Boeck *et al.*, 2006), glicosídios iridoides (Mittal *et al.*, 1998), flavonoides (ARAÚJO *et al.*, 1998), lignanas (BARATA *et al.*, 2000; ROYO *et al.*, 2003) e de alcalóides (MAHIOU *et al.*, 1994; FOURNET *et al.*, 1996; QUEIROZ, *et al.*, 1996).

Com uma variedade de estudos voltados para o descobrimento de potenciais bioativos com atividade leishmanicida, ainda existem muitas espécies vegetais com possíveis atividades anti-*Leishmania* a serem exploradas. Devido às atividades destes agentes e à sua gama variada de efeitos sobre a biologia do parasita, compostos como os flavonoides são uma fonte rica potencial de medicamentos candidatos contra a leishmaniose. Além da toxicidade direta contra protozoários parasitas exibida por flavonoides, estes compostos, bem como algumas isoflavonas e chalconas também são conhecidos como agentes que podem reverter à resistência a múltiplas drogas (MDR) de parasitas (SCHMIDT, T.J, *et al.*, 2012).

Os flavonoides são uma classe de compostos fenólicos que diferem entre si pela sua estrutura química e características particulares. Frutas, vegetais, grãos, flores, chá e vinho são exemplos de fontes destes compostos (NIJVELDT, R.J *et al.*, 2001). A quercetina (3, 5, 7,3'-4'- penta-hidroxi flavona) é o principal flavonoide presente na dieta humana e o seu consumo diário estimado, varia entre 50 e 500 mg (DESESCHNER, E.E. *et al.*, 1991). Esses compostos fenólicos são antioxidantes efetivos devido à suas propriedades sequestrantes de radicais livres e por quelar íons metálicos (KANDASWAMI, C.; MIDDLETON, E.J.R., 1994). Além destes efeitos importantes, os flavonoides têm propriedades estabilizadoras de membrana, podendo afetar alguns processos do metabolismo intermediário (GALATI, G. *et al.*, 2003).

Embora a pesquisa esteja a cada dia mais comprometida para o avanço de terapias eficazes anti-*Leishmania*, o progresso nesse campo não tem sido muito significativo. A vacinação aparece, então, como uma possível maneira de se controlar a

leishmaniose. Entretanto, até agora, poucas foram as estratégias de imunização, em humanos, que tiveram algum sucesso (DE ALMEIDA, M.C., *et al.*, 2003). Dentre os inúmeros flavonoides descritos na literatura com a potencial ação leishmanicida contra a *Leishmania amazonensis*, o composto fenólico escolhido como nosso objeto de estudo foi a quercetina, pois a quercetina possui uma ampla variedade de ações biológicas incluindo efeitos antioxidante, antihipertensivos, anti-inflamatórios, atividade antimicrobiana e antiprotozoários, embora, o mecanismo molecular de ação do extrato da quercetina ainda não ter sido demonstrado (BISCHOFF S.C., 2008 ; MAMANI-MATSUDA M, *et al.*, 2004).

Tem sido demonstrado que a quercetina possui efeito sobre o crescimento de *L. amazonensis*, aonde os parasitas foram incubados, com diferentes concentrações de quercetina (3 μ M-96 μ M) durante 24 a 96 horas. A incubação com a quercetina inibiu o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis*, dependendo do tempo e da dose a qual os parasitas foram expostos. O efeito inibidor do flavonoide foi igual a 66% depois 48 horas, com 96 μ M. A CI_{50} para a quercetina em 48 horas foi de 31,4 μ M. A detenção total de crescimento foi observada após incubação de formas promastigotas de *L. amazonensis*, com 96 μ M de quercetina às 96 horas. Este resultado certificou a atividade leishmanicida de quercetina contra *L. amazonensis* (FONSECA-SILVA, F. *et al.*, 2011).

Estudos recentes mostraram que a quercetina induz uma alteração no potencial de membrana de formas promastigotas de *L. amazonensis*. Para comprovar essa hipótese, os pesquisadores mediram o potencial de membrana das células, usando o marcador rodamina fluorescente 123, que se acumula dentro de mitocôndrias energizadas, e analisaram os dados usando a citometria de fluxo (FONSECA-SILVA, F. *et al.*, 2011). O mesmo estudo observou que em células de mamíferos, a despolarização do potencial de membrana aumenta a produção celular de espécies reativas de oxigênio (ERO) e subsequente morte celular (ESPOSITO, M., *et al.*, 1999). Utilizando como base as informações disponíveis na literatura, esse projeto teve o objetivo de testar diferentes concentrações do flavonoide quercetina na atividade anti-*Leishmania* para a espécie *L. amazonensis*, avaliar a ação da quercetina, na taxa de infecção de monócitos por esse protozoário e avaliar o efeito citotóxico de diferentes concentrações deste flavonoide, nas culturas de *L. amazonensis*, utilizando a citometria de fluxo.

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

2.1 As espécies de *Leishmania*

2.2.1 Classificação

Os parasitas do gênero *Leishmania* pertencem ao Reino: Protista, Subreino: Protozoa, Filo: *Sarcomastigophora*, Subfilo: *Mastigophora*, Classe: *Zoomastigophora*, Ordem: *Kinetoplastida*, Subordem: *Trypanosomatina*, Família: *Trypanosomatidae*, Gênero: *Leishmania*. O gênero *Leishmania* também pode ser subdividido em dois subgêneros: O subgênero *L.(Viannia)* e *L.(Leishmania)* (DA SILVA, 2013).

Durante muitos anos a classificação deste gênero a princípio baseava-se em características extrínsecas, como: manifestações clínicas, distribuição geográfica, vetores, reservatórios e padrões epidemiológicos (BAÑULS *et al.*, 2007; VALE ; FURTADO, 2005). Entretanto, em meados da década de 1960, a classificação ganhou novo impulso ao analisar critérios intrínsecos tais como imunológicos, bioquímicos e moleculares. Estes estudos divulgaram que avaliar somente manifestações clínicas e aspectos geográficos era inadequado, assim sendo, hoje em dia estes critérios são utilizados para definir espécies de *Leishmania*.

Mais de 30 espécies de *Leishmania* foram identificadas e destas, cerca de 20 são patogênicas para o ser humano (BAÑULS *et al.*, 2007; NEUBER, 2008). No Brasil, são atualmente reconhecidas 8 espécies dermatrópicas de *Leishmania* causadoras de doença humana, sendo seis do subgênero *Viannia* e duas do subgênero *Leishmania*. As três principais espécies são: *L.(L.) amazonensis*, *L.(V.) guyanensis* e *L. (V.) braziliensis* e, mais recentemente, as espécies *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindenberg* e *L. (V.) shawi* foram identificadas em estados das regiões Norte e Nordeste (LAISON, 2010; BRASIL, 2010). A espécie que foi avaliada neste estudo, *Leishmania amazonensis*, pertence ao subgênero *Leishmania*, e está agrupada no complexo *L. (L.) mexicana* (Figura 1).

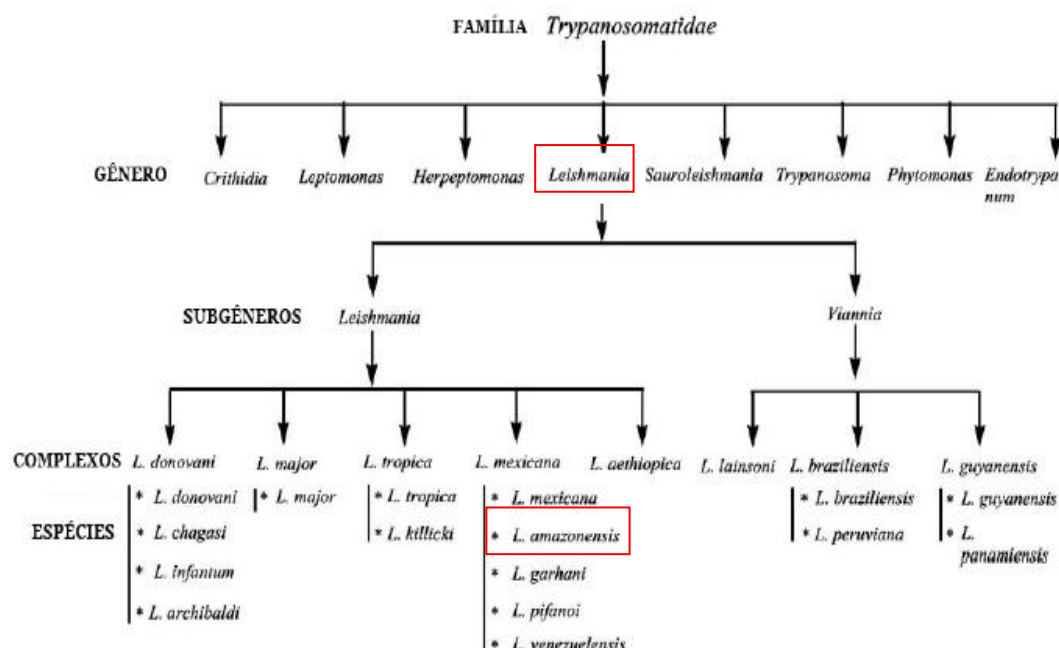


Figura 1: Taxonomia do gênero *Leishmania*. Fonte: Adaptado de Mishra *et al.*, (2009).

2.1.2 Estrutura

Protozoários do gênero *Leishmania* são parasitas intracelulares obrigatórios e possuem um ciclo de vida digenético, ou seja, desenvolvem-se em dois hospedeiros distintos e se apresentam sobre duas formas evolutivas: a forma promastigota, presente no hospedeiro invertebrado e a forma amastigota no hospedeiro vertebrado (BAÑULS *et al.*, 2007; ALCOLEA *et al.*, 2010). Estas duas formas são resultado de uma adaptação à mudança ambiental e as condições encontradas pelos parasitas dentro de seus dois hospedeiros.

As formas flageladas, promastigotas, são extracelulares e móveis, com corpo celular fusiforme, alongado e são encontradas no trato digestivo do inseto vetor, flebótomo. Elas apresentam um longo flagelo externalizado que emerge do corpo do parasita na sua porção anterior, proporcionando mobilidade ao protozoário. Numa região mediana do corpo se encontra o núcleo, já o cinetoplasto está localizado na porção mais anterior, próximo à bolsa flagelar de onde emerge o flagelo. O tamanho das formas promastigotas pode variar de acordo com a espécie (Figura 2A).

Já as formas amastigotas são parasitas intracelulares de células do sistema fagocítico mononuclear (SFM). Apresentam corpo celular pequeno de contorno ovóide.

Elas possuem flagelo curto e internalizado na bolsa flagelar, uma invaginação do corpo do parasita, e são pouco móveis (Figura 2B). Na bolsa flagelar não são encontrados microtúbulos subpeliculares e há grande atividade de excreção e de pinocitose. O cinetoplasto presente em ambas as formas, é uma região que apresenta o DNA mitocondrial altamente condensado em uma região perpendicular a base do flagelo, característico da ordem *Kinetoplastida* (DE SOUZA, 2008). No citoplasma ainda são observados o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático, além de vacúolos e inclusões.

As formas promastigotas e amastigotas multiplicam-se por divisão binária. O processo de divisão tem início com a produção de um segundo flagelo, seguido pelo núcleo, cinetoplasto e divisão do corpo celular longitudinalmente no sentido ântero-posterior, produzindo duas novas células (SIMPSON ; KRETZER, 1997; WHEELER *et al.*, 2011).

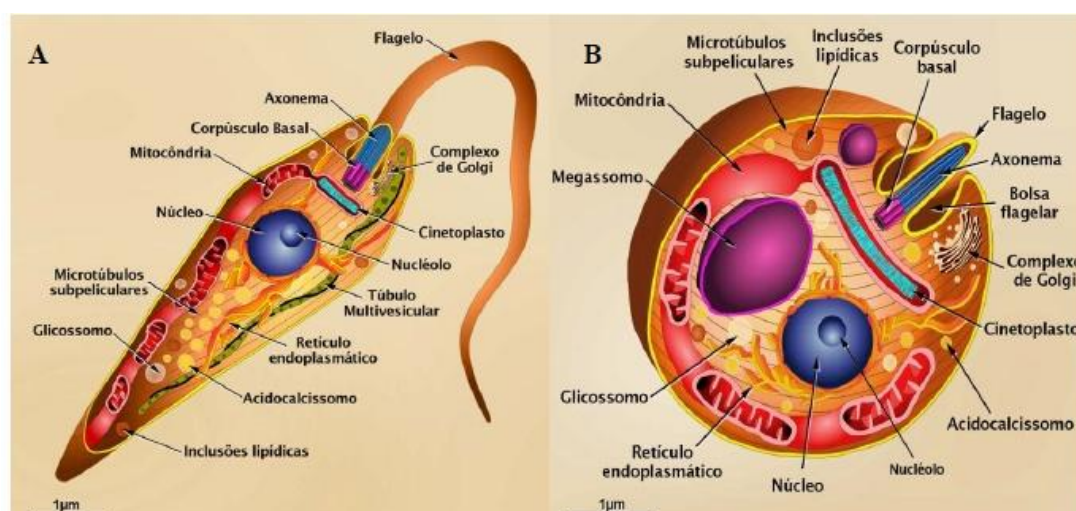


Figura 2: Formas desenvolvidas do parasita *Leishmania* spp. promastigota (A) e amastigota (B). Desenho ilustrativo das principais organelas intracelulares das formas evolutivas de *Leishmania*. A bolsa flagelar está localizada na porção anterior da célula. Fonte: Adaptado de Teixeira *et al.*, 2013.

2.1.3 Ciclo de vida do parasita

Os ciclos de transmissão da leishmaniose se diferenciam de acordo com a região geográfica, espécie de parasita, vetores, reservatórios e hospedeiros. A *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* que foi a espécie de *Leishmania* utilizada nesse trabalho, é uma espécie com mais ampla distribuição, tendo sido notificada em todas as regiões brasileiras. O ciclo de transmissão ocorre em áreas florestais da Amazônia legal (Amazonas, Pará, Tocantins e Maranhão), e também em alguns Estados do Nordeste

(Bahia), do Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), Centro-Oeste (Goiás) e Sul (Paraná) (BRASIL, 2010).

Os hospedeiros vertebrados são infectados por formas promastigotas metacíclicas, transmitidas por fêmeas dos insetos vetores, durante o repasto sanguíneo. O vetor possui um aparelho bucal curto e rígido, adaptado para dilacerar o tecido e vasos sanguíneos do hospedeiro, isso é de suma importância para inoculação e ingestão das formas infectantes (MAURER *et al.*, 2009; KAYE; SCOTT, 2011). Na pele as formas promastigotas serão reconhecidas e fagocitadas por células do SFM sendo internalizadas em vacúolos parasitóforos. Após a internalização ocorre a fusão do vacúolo parasitóforo com lisossomos, formando o fagolisossomo onde por ação de enzimas, alterações do pH e temperatura, as formas promastigotas transformam-se em forma amastigota (ALCOLEA *et al.*, 2010; GLUENZ *et al.*, 2010). Esta forma de resistência mantém o controle das condições ambientais internas do vacúolo e passa a se replicar no interior de macrófagos até sua ruptura, passando a infectar outras células (macrófagos, células dentríticas, neutrófilos e mastócitos), atraídos para o lugar da inoculação, onde ocorre uma reação inflamatória e posterior recrutamento de células T e formação de granuloma (MAURER *et al.*, 2009; KAYE ;SCOTT, 2011).

A infecção do hospedeiro invertebrado ocorre após a ingestão de formas amastigotas durante o repasto sanguíneo de um indivíduo infectado. No intestino do inseto vetor, primeiramente, ocorre a transformação das formas amastigotas em promastigotas procíclicas. Após, aproximadamente, 5 dias, no intestino médio, os parasitas deixam de se multiplicar e diferenciam-se em promastigotas metacíclicas, formas infectantes para o hospedeiro vertebrado (WILSON *et al.*, 2010). A metaciclogênese é um processo onde promastigotas deixam de se reproduzir e passam a ser infectante devido, principalmente, a alterações nos seus constituintes de membrana, como o alongamento da molécula de Lipofosfoglicano (LPG), e a presença de glicoproteína (GP63), principais fatores de virulência (BATES 2007; CORRALES *et al.*, 2010). O ciclo de vida se completa quando há infecção de um novo flebotomíneo ao se alimentar de hospedeiros infectados (Figura 3).

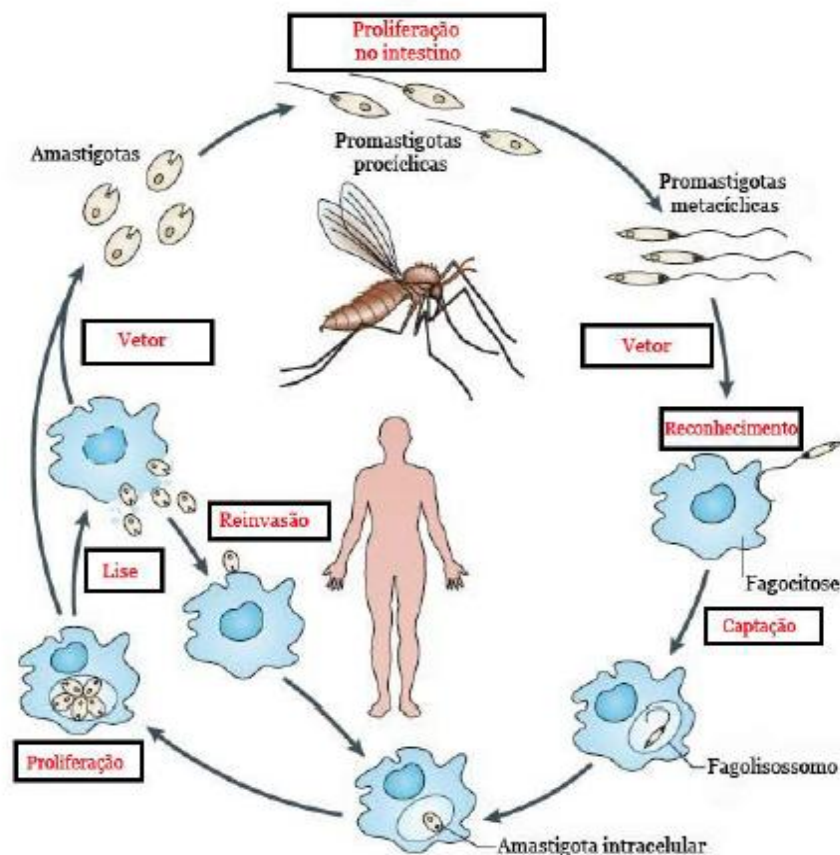


Figura 3: Ciclo de vida do parasita do gênero *Leishmania* spp.
 Fonte : Adaptado de Kaye ; Scott, 2011.

2.2 A Leishmaniose

2.2.1 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

A LTA é uma doença infecciosa, não contagiosa, de evolução crônica, que acomete estruturas da pele de forma localizada ou difusa (BASANO ; CAMARGO, 2004; DAVID ; CRAFT, 2009), causada por diferentes espécies de protozoários do gênero *Leishmania*. É transmitida por vetores artrópodes, que primariamente causam uma infecção de caráter zoonótico, acometendo animais domésticos e o homem, o qual pode ser envolvido de maneira secundária (PATEL ; SETHI, 2009; BRASIL, 2010).

2.2.2 Aspectos epidemiológicos, clínicos e imunológicos

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma das principais doenças transmitidas por vetores no mundo e apresenta grande magnitude e distribuição territorial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco, com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano. Cerca de 82 países relataram casos de leishmaniose cutânea, com uma prevalência de 1 a 1,5 milhões de novos casos por ano. O Brasil está entre os países de maior incidência das formas cutânea e mucocutânea (ALVAR, *et al*, 2012). No período de 2010, foram registrados no Brasil aproximadamente 22.000 casos de leishmaniose tegumentar (Figura 4), e cerca de 32% dos casos foram registrados só na região Norte. Ainda assim o número de casos está bem menor do que aqueles registrados nos anos anteriores indicando uma possível redução de casos (BRASIL, 2011 Sinan/SVS/MS).

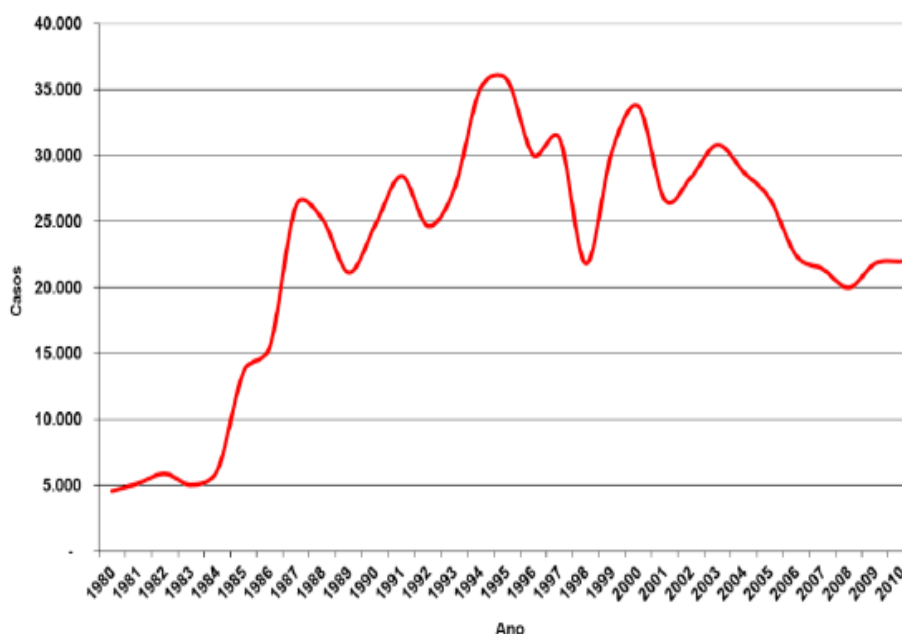


Figura 4: Casos notificados de leishmaniose tegumentar americana, Brasil – 1980 a 2010.

Fonte: Brasil, 2011 em Sinan SVS-MS * Dados sujeitos a alterações.

A leishmaniose tegumentar na atualidade está presente em países com diferentes realidades socioculturais, onde há uma diversidade de espécies e encontra-se em fase de crescimento geográfico. Nos últimos vinte anos, as avaliações de estudos epidemiológicos demonstraram mudanças no comportamento da doença. Mudanças ambientais, tais como desmatamento, construção de barragens, urbanização, e ainda aumento de viagens e migração de pessoas não-imunes para áreas endêmicas têm

contribuído nessa mudança de perfil da doença (SILVA ; MUNIZ, 2009; AMEEN, 2010; GOTO ; LINDOSO, 2010). A interação entre o parasita e a resposta imunológica do hospedeiro pode suscitar uma série de eventos responsáveis pela ocorrência de diversas manifestações clínicas. A LTA, usualmente conhecida como “ferida brava” ou “úlcerade-Bauru”, devido a sua complexidade pode apresentar-se em diferentes formas clínicas: (1) leishmaniose cutânea localizada (Figura 5A), representa o acometimento primário da pele, ocorre geralmente no local da picada do inseto e é caracterizada pelo aparecimento de lesões arredondadas, geralmente indolores, podendo apresentar úlceras ou não; (2) leishmaniose mucocutânea (Figura 5B), caracterizada pelo aparecimento de lesões destrutivas, acometendo mucosas, principalmente, na face, véu palatino, faringe ou laringe; (3) leishmaniose cutânea difusa (Figura 5C), constitui uma forma menos incidente do que as anteriores, porém grave, que ocorre em pacientes anérgicos, produz lesões cutâneas nodulares não ulceradas, múltiplas e disseminadas, contendo elevado número de amastigotas (SILVEIRA *et al.*, 2004; NYLÉN ; EIDSMO, 2012).



Figura 5: Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar. (A) Leishmaniose cutânea localizada; (B) Leishmaniose mucocutânea; (C) Leishmaniose cutâneo-difusa. Fonte: Silveira *et al.*, 2004.

A espécie *Leishmania (L.) amazonensis*, é considerada o agente de duas formas distintas da leishmaniose cutânea: A leishmaniose cutânea localizada (LCL) e a leishmaniose cutânea difusa (LCD) forma mais grave e de difícil tratamento. A LCD é descrita em alguns países dos continentes americano e africano, apresentando uma evolução crônica, com capacidade de produzir deformidades em extremidades, e acomete pacientes considerados anérgicos, com deficiência específica na resposta imune celular contra a *Leishmania* (COSTA *et al.*, 2005).

A leishmaniose disseminada (LD) é tida, atualmente, como uma forma emergente da leishmaniose, apesar de há até pouco tempo ter sido considerada uma

forma rara da doença. Tem sido especialmente descrita no Brasil, nas regiões Norte e Nordeste, e seu principal agente etiológico é a *L. amazonensis*. As lesões se distribuem, principalmente, na face e nos membros superiores e, apresentam-se com ulcerações rasas, porém com a base rígida, além de lesões papulares e tuberosas (Figura 6A) (MARSDEN P.D. ; JONES T.C., 1985). Caracteriza-se também pela presença de múltiplas lesões de pele, ulceradas ou não, encontradas simultaneamente em 2 ou mais áreas adjacentes do corpo do paciente (sugerindo uma disseminação do parasita por via sanguínea), as quais podem ser precedidas por período febril transitório (Figura 6B) (MARSDEN P.D.; JONES T.C., 1985; DESJEUX, P., 1992; MINISTÉRIO DA SAÚDE., 2007; SCHRIEFER A.; SCHRIEFER A.L.F.; GÓES-NETO A., *et al.*, 2009). Ocorre acometimento mucoso em pelo menos $\frac{1}{4}$ dos pacientes (Figura 6C) (SCHRIEFER A.; SCHRIEFER A.L.F.; GÓES-NETO A., *et al.*, 2009). A doença ocorre em indivíduos sem qualquer distúrbio imunológico aparente; no entanto, a resposta imunitária específica parece estar retardada, pois cerca de 30% dos doentes apresentam teste Montenegro negativo (MARSDEN P.D. ; JONES T.C., 1985). As lesões mucosas podem surgir junto com as lesões cutâneas, meses ou vários anos depois de as lesões cutâneas já terem cicatrizado.



Figura 6: Manifestações clínicas da Leishmaniose Disseminada. (A) Forma cutânea disseminada. Paciente com acometimento facial, apresentando múltiplas lesões ulceradas. (B) Paciente apresentando múltiplas lesões papulares, algumas com ulceração superficial. (C) Paciente com acometimento mucoso, envolvendo nariz e mucosa oral. Observar lesão na língua, que raramente é acometida na forma clínica da leishmaniose mucosa. Fonte: Brasil; 2007.

2.3 Tratamento das leishmanioses

Atualmente o tratamento da leishmaniose é baseado em uma variedade de drogas e ainda não existe uma vacina contra a doença (BAILEY ; LOCKWOOD, 2007; OKWOR ; UZONNA, 2009). Apesar de existir várias espécies de *Leishmania* e diversas manifestações clínicas dessa patologia, os mesmos medicamentos são utilizados para tratar essa antropozoonose, independente da espécie causadora da doença (GOTO; LINDOSO, 2010). O tratamento da leishmaniose é feito principalmente com antimoniais pentavalentes: antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime[®]) e estibogluconato de sódio (Pentostan[®]), que são drogas de primeira escolha para o tratamento de todas as formas clínicas da leishmaniose (FRÉZARD ; DEMICHELI, 2010). Entretanto, nos últimos anos, ocorreu um aumento da resistência aos antimoniais, e a razão para surgimento de resistência foi o uso indiscriminado do medicamento (ASHUTOSH *et al.*, 2007; PALUMBO, 2010).

Ademais, essas drogas necessitam de injeções diárias, têm custo elevado, alta toxicidade causando efeitos adversos nos pacientes, incluindo pancreatite, mialgias, fadiga, náuseas e cefaleia, além disso, é contraindicado para pacientes cardio, nefro e hepatopatas e, por serem abortivos, não devem ser administrado a gestantes (PATEL ; SETHI, 2009; CHAKRAVARTY ;SUNDAR, 2010). Não havendo resposta plausível ou sendo detectada resistência aos antimoniais pentavalentes, são então administradas as drogas de segunda escolha, que são as anfotericinas e pentamidinas (BRASIL, 2010).

A anfotericina B é um antibiótico poliênico que possui atividade seletiva sobre *Leishmania* devido à alta afinidade ao ergosterol, um esterol prevalente na membrana desse parasita (POLONIO ; EFFERTH, 2008). Também existe a Anfotericina B Lipossomal, que também está sendo utilizada como droga de segunda escolha (CROFT *et al.*, 2006). Nesta formulação, a droga atinge níveis plasmáticos mais proeminentes que a Anfotericina B convencional. No Brasil, essa droga está registrada na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para uso no tratamento da leishmaniose visceral (BRASIL, 2010). Wortmann *et al.*, (2010) constataram que o tratamento com Anfotericina B lipossomal se mostrou eficaz contra leishmaniose cutânea e pode ser uma alternativa viável, porém tem custo elevado. Já as pentamidinas, são diamidinas aromáticas, que apresentam eficácia contra algumas espécies de *Leishmania* do Novo Mundo como *L. panamensis* e *L. guyanensis* (BAILEY; LOCKWOOD, 2007; BLUM ; HATZ, 2009), além da eficácia no tratamento da leishmaniose visceral (LV). Esta droga

interfere na síntese de DNA, modificando a morfologia do cinetoplasto e fragmentando a membrana mitocondrial do parasita (GOTO; LINDOSO, 2010).

Uma droga recente, inicialmente desenvolvida com intuito de ser utilizada para o tratamento de câncer, a miltefosina, teve sua atividade leishmanicida descoberta no ano de 1980. Esta droga atua interferindo na membrana celular do parasita, sem interagir com o DNA, modula a composição lipídica, a permeabilidade e fluidez da membrana, assim como o metabolismo de fosfolipídeos, induzindo morte celular por apoptose (COSTA FILHO *et al.*, 2008). Estas descobertas levaram a ensaios clínicos na Índia em 2002, para o tratamento oral da Leishmaniose Visceral (MITROPOULOS *et al.*, 2010). Soto *et al.* (2001) observaram que após o tratamento com miltefosina de pacientes colombianos com LT, a taxa de cura foi de 91%, enquanto que em outro trabalho realizado com pacientes da Guatemala, a taxa de cura foi de 53% (SOTO ; BERMAN, 2006). Várias drogas encontram-se em diferentes estágios de desenvolvimento para a sua possível utilização no tratamento de pacientes com leishmaniose, como Sitamaquina, Itraconazol, Cetoconazol, Fluconazol e Paromomicina (CROFT; COOMBS, 2003; GARNIER *et al.*, 2006; BARONI *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2009; SKLAVOS *et al.*, 2010; EL-SAYED ; ANWAR, 2010).

2.3.1 Flavonoides

Flavonoides são metabólitos secundários sintetizados pelas plantas e pertencem ao grupo dos compostos fenólicos (HUBER ; RODRIGUES- AMAYA,2008). Os flavonoides são formados pela combinação de derivados sintetizados a partir da fenilalanina (via metabólica do ácido chiquímico) e ácido acético. Primeiramente, a fenilalanina é transformada em ácido cinâmico pela ação da fenilalanina amônio liase, enzima que liga os metabolismos primário (via do ácido chiquímico) e secundário (fenilpropanóides). O ácido cinâmico é hidrolisado a ácido cumárico (C9) que é transformado em 4-cumaroil-CoA e este é condensado a 3 unidades de malonil-CoA (C2) formando uma chalcona (C15), a partir da qual todos os flavonóides são formados (WINKEL-SHIRLEY, B., 2001).

A atividade biológica dos flavonoides e de seus metabólitos depende da sua estrutura química e dos vários substituintes da molécula, uma vez que a estrutura básica pode sofrer uma série de modificações, tais como, glicosilação, esterificação, amidação, hidroxilação, entre outras alterações que irão modular a polaridade, toxicidade e

direcionamento intracelular destes compostos (WINKEL-SHIRLEY, B., 2001). Os flavonoides (exceto as catequinas) são encontrados em plantas principalmente na forma glicosilada, ou seja, ligados a moléculas de açúcares, sendo normalmente o- glicosídeos, com a molécula de açúcar ligada ao grupo hidroxila na posição C3 ou C7 (ERLUND, I., 2004 ; HERMANN, K., 1988). Os açúcares mais comuns são D-glicose e L-ramnose, porém, pelo menos 8 monossacarídeos diferentes ou combinações destes podem ligar-se aos diferentes grupos hidroxilas do flavonoide, resultando em um grande número de glicosídeos conhecidos. As moléculas desprovidas de açúcares são denominadas agliconas.

2.3.2 Possíveis benefícios dos flavonoides para a saúde

De maneira histórica, os compostos polifenólicos foram considerados antinutrientes, devido a alguns efeitos adversos no metabolismo humano, exercidos principalmente pela classe dos taninos. Os taninos são considerados metabólitos secundários de algumas plantas proporcionando muitos benefícios para a saúde humana.

Nos últimos anos, o conhecimento das propriedades antioxidantes dos compostos fenólicos despertou um novo interesse em relação aos possíveis efeitos benéficos à saúde (WINKEL-SHIRLEY, B., 2001). Dentre os compostos fenólicos, os flavonoides são os que mais se destacam em relação às propriedades relacionadas à saúde humana, essas propriedades são baseadas principalmente na sua atividade antioxidante, atuando como sequestradores de radicais livres e quelantes de metais capazes de catalisar a peroxidação de lipídeos (PRIOR, R. L.; CAO, G. 2000; SPENCER, J.P.E. *et al.*, 1998; STAPLETON, A.E.; WALBOT, V., 1994). Estudos demonstram que a quercetina (Figura 8) possui um excelente potencial antioxidante *in vitro*, sendo o flavonóide com o maior poder sequestrador de espécies reativas de oxigênio. Este elevado poder antioxidante se deve à presença do grupo catecol no anel B e do grupo hidroxila na posição 3 do anel C (HEIJNEN, C.G. *et al.*, 2002).

Os mecanismos exatos pelos quais os flavonoides (Figura 7) exercem seus efeitos favoráveis à saúde ainda não foram completamente elucidados. Porém, estudos mais recentes especulam a improvável atuação apenas pela sua clássica atividade antioxidante na explicação dos seus efeitos celulares. Estas evidências baseiam-se primariamente em estudos que mostram que os flavonóides são extensamente metabolizados *in vivo*, resultando em significantes alterações no seu potencial redox.

Estudos mostram que as formas biotivas dos flavonoides não são aquelas encontradas nas plantas, como por exemplo, os glicosídeos ou agliconas, mas sim metabólitos e formas conjugadas destes compostos, absorvidos no intestino (DAY, A.J.; WILLIAMSON, G., 2003; DONOVAN, J.L.; WATERHOUSE, A.L., 2003; SPENCER, J.P.E. *et al.*, 2001; SPENCER, J.P.E. *et al.*, 2003; WALLE, T. *et al.*, 2003).

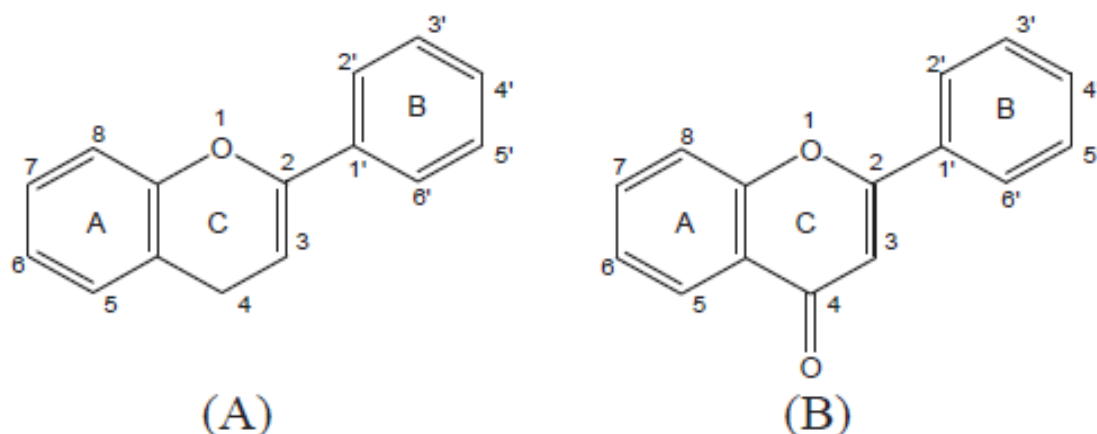


Figura 7: (A) Estrutura básica dos flavonóides. (B) Estrutura básica dos flavonóides com grupo carbonila C-4. Fonte: Adaptado de Winkel-Shirley, B. (2001).

Observou-se também que as concentrações de flavonoides e seus metabólitos acumulados *in vivo*, por exemplo, no plasma ou em órgãos como o cérebro é menor que aquelas reportadas para antioxidantes como ácido ascórbico e tocoferol (HALLIWELL, B., *et al.*, 2000). Deste modo, torna-se improvável que os flavonoides exerçam seus efeitos antioxidantes competindo com outros compostos presentes em concentrações maiores. Estas pesquisas sugerem a atuação dos flavonoides como mediadores, através da interação com proteínas específicas, fundamentais na cascata intracelular sinalizante (SCHROETER, H. *et al.*, 2002; WILLIAMS, R.J.; SPENCER, J.P. *et al.*, 2004; MOON, Y.J.; WANG, X. *et al.*, 2006; PACIFICI, G.M., 2004; SCHWARZ, D.; KISSELEV, P. *et al.*, 2005).

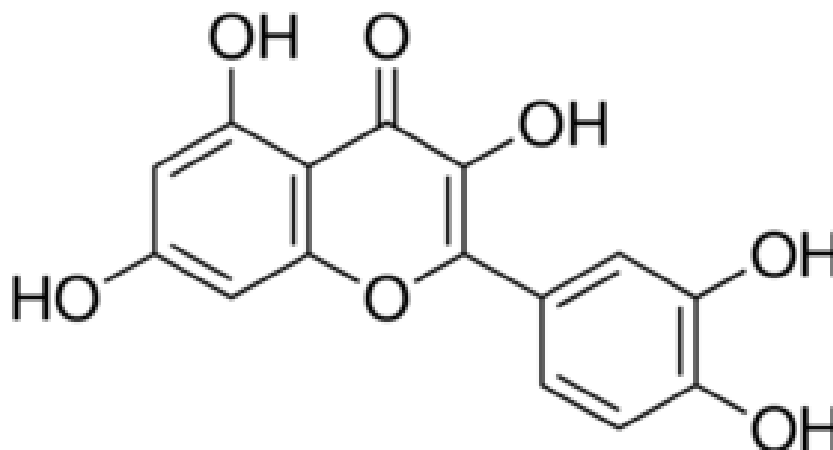


Figura 8: Estrutura química da quercetina.

Fonte: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/q4951?lang=pt®ion=BR>.

Foi relatado que os flavonoides possuem a propriedade de inibir a proliferação celular, atividade estrogênica, anti-inflamatória, antifibrótica, anticoagulante, antibacteriana, anti-aterogênica e antihipertensiva (KUNTZ, S.; WENZEL, U., 1999; ORSOLIC, N. *et al.*, 2004; WENZEL, U. *et al.*, 2000; MIKSICEK, R.J., 1995; READ, M.A., 1995; LEE, E.S. *et al.*, 2003; BUCKI, R. *et al.*, 2003; CUSHNIE, T.P.; LAMB, A.J., 2005; PEREZ-VIZCAINO, F. *et al.*, 2006).

Existem poucos dados reais sobre a composição de alguns alimentos com os flavonóis e flavonas mesmo em nível mundial e, no Brasil essa insuficiência é ainda mais evidente. Um ensaio investigando os teores de flavonóis e flavona em chás comercializados no Brasil demonstrou que os chás pretos e verdes e também a erva mate apresentam uma concentração elevada em quercetina, sendo as duas primeiras, fontes de miricetina e kaempferol e o último de kaempferol. Os chás de camomila, boldo e morango são boas fontes de flavonoides, embora menos ricas que os chás verdes e pretos (MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B., 2006).

Em diferentes cultivares de 9 frutas brasileiras, totalizando 20 amostras alimentícias normalmente consumidas no Brasil, Hoffmann-Ribani *et al.* (2005) encontraram quercetina, com exceção de manga e mamão. As maiores concentrações foram constatadas em acerola, pitanga e maçã (cultivar Fuji). A acerola foi a fruta que se destacou apresentando os maiores teores de kaempferol e a pitanga as maiores concentrações de miricetina. A apigenina e luteolina não foram detectadas em nenhuma das 20 frutas analisadas (HOFFMANN-RIBANI, R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B., 2005). Estudando frutas amazônicas, Drago *et al.* (2008), relataram altas quantidades

de quercetina em murici e taperebá, sendo que os teores em taperebá foram maiores que em todas as frutas investigadas por Hoffmann-Ribani *et al.* (2005), maiores que os teores encontrados em maçã, fruta reconhecida internacionalmente como uma rica fonte deste composto.

Além de quercetina, miricetina foi também encontrada em taperebá (DRAGO I.S.; HUBER, L.S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B., 2008; HOFFMANN-RIBANI, R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B., 2005). Huber *et al.* (2008) avaliaram as fontes de flavonoides entre as hortaliças consumidas no Brasil, analisando inicialmente 20 diferentes hortaliças e verificaram que as principais fontes são cebola, couve e rúcula com altos teores de quercetina, rúcula e couve com altos teores de kaempferol e salsa com grande quantidade de apigenina (HUBER, L.S.; HOFFMANN-RIBANI, R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D.B., 2008). Arabbi *et al.* analisaram alface, almeirão, cebola, laranja, pimentão, rúcula, maçã e tomate e encontraram os maiores teores de quercetina em cebola roxa, seguido por cebola branca. Kaempferol foi encontrado apenas em almeirão e rúcula. (ARABBI, P.R.; GENOVESE, M.I.; LAJOLO, F.M., 2004). Dessa forma fica clara a importância do estudo da quercetina em áreas ainda não muito exploradas que venham auxiliar descobertas importantes no âmbito do tratamento das leishmanioses.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a atividade anti-*Leishmania* em *L. amazonensis* da quercetina *in vitro*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

✓ Avaliar a atividade anti-*Leishmania* da quercetina sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*;

✓ Avaliar a ação da quercetina, na taxa de infecção de monócitos pela *L. amazonensis*;

✓ Avaliar o efeito citotóxico de diferentes concentrações da quercetina nas culturas de *L. amazonensis*;

✓ Avaliar a possível toxicidade da quercetina aos glóbulos vermelhos humanos;

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Cultura de Parasitas

Promastigotas de *Leishmania amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8) utilizadas nesse trabalho foram obtidas da Fundação Oswaldo Cruz (FioCruz) do Rio de Janeiro. Elas foram mantidas em meio Schneider[®], suplementado com 20% de soro bovino fetal, 2% de urina humana masculina e antibióticos (penicilina 200U/mL e estreptomicina 0.1 mg/mL), em estufa com demanda biológica de oxigênio (B.O.D) a 26 °C. Foram realizados repiques semanais até um total de 5 passagens, garantindo a infectividade dos parasitos. As promastigotas utilizadas em fase exponencial de crescimento estavam no quarto dia de crescimento. Os parasitas foram contados em câmara Neubauer e utilizados nos ensaios de teste anti-*Leishmania* e infecção em monócitos.

4.2 Droga

A quercetina (C₁₅H₁₀O₇) foi adquirida da Sigma Aldrich, cujo peso molecular é 302,24 g/mol. A sua estrutura foi apresentada na figura 7. As diluições necessárias para o estudo foram preparadas em sala escura, pois a quercetina é fotossensível, e com a presença de luz poderia haver alteração da sua estrutura química. Depois de feita a diluição da droga, a mesma possui uma durabilidade de 24 horas.

4.3 Determinação de atividade anti-*Leishmania*

4.3.1 Determinação de atividade anti-*Leishmania* pelo método do MTT

Avaliou-se a atividade anti-*Leishmania* sobre formas promastigotas utilizando o teste do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-zil)-2,5-difeniltetrazolio (MTT – Amresco, Ohio, EUA). Formas promastigotas de *L. amazonensis* numa concentração de 1 x 10⁶/ml. Leishmanias por poço, foram semeadas em placas de cultivo celular com 96 poços, contendo 100 µL de meio Schneider, pH 6,8, suplementado a 20% de SFB e diferentes concentrações da quercetina e da anfotericina B. As placas foram incubadas em estufa B.O.D. na temperatura de 26°C por 72 h. Ao final da incubação foram adicionados 10 µL de MTT diluído em PBS, atingindo uma concentração final de 5

mg/mL e incubadas por mais 4 h. Em seguida foram adicionados 50 µL de uma solução de PBS a 10% de dodecil sulfato de sódio (DSS) e deixado *overnight* para completa dissolução do formazan. Por último, foi realizada a leitura em espectrofotômetro (Biotek modelo ELx800) a 570 nm. O controle negativo foi realizado com meio Schneider a 0,5% de DMSO e considerado como 100% de viabilidade dos parasitas.

4.3.2 Atividade anti-*Leishmania* por microscopia óptica

Promastigotas de *L. amazonensis* na fase logarítmica de crescimento foram mantidas em placas de 24 poços na concentração de 1×10^6 parasitas/poço. Em seguida, o flavonoide Quercetina (Sigma-Aldrich) foi adicionado em diluições de 2000µM, 1000µM, 500 µM, 250 µM e 100 µM previamente testadas, aos poços. Em seguida, foi adicionado em cada poço, concentrações da quercetina, de modo que o volume final fosse de 1000 µL. O controle negativo foi realizado com meio Schneider a 0,5% de DMSO e considerado como 100% de viabilidade dos parasitas. O controle positivo utilizado para comparar a atividade leishmanicida foi o Glucantime®. A placa foi incubada numa incubadora B.O.D. a 26°C. Após 24, 48 e 72 h, alíquotas das culturas de cada poço foram retiradas, diluídas em solução de isotom (10,5 g de ácido cítrico, 7 g de NaCl, 15 mL de formol em 1 L de água destilada), depois foram submetidos sob vigorosa agitação em vórtex. Ao fim deste processo, os parasitas foram quantificados sob microscopia óptica comum diretamente em câmara de Neubauer, a fim de monitorar seu crescimento e determinar a atividade anti-*Leishmania*.

4.4 Obtenção de leucócitos para ensaios biológicos

Células sanguíneas de 3 indivíduos saudáveis foram processadas e aproximadamente 10 mL de sangue heparinizado de cada um dos indivíduos foram utilizados. Leucócitos foram obtidos pela lise de hemácias (0,07g de bicarbonato de amônio, 7,0g de cloreto de amônio, H₂O Milli-Q). As células foram lavadas uma vez com tampão PBS, sendo centrifugadas a 1200rpm, 4°C, 10 min. Os leucócitos obtidos foram ressuspensos em um volume de 1 mL de Solução Salina de Fosfato Tamponada (PBS)1x (8g de NaCl; 0,2 de KCl; 1,44g de Na₂HPO₄; 0,24g de KH₂PO₄; H₂O destilada) e utilizados para análises biológicas. Os indivíduos saudáveis foram selecionados de acordo com uma anamnese detalhada. Todos os indivíduos que contribuíram para a realização deste trabalho participaram voluntariamente da pesquisa, sendo esclarecidos

sobre a importância do trabalho, e assinaram o termo de consentimento esclarecido (TCLE). Esse trabalho foi submetido e aprovado ao comitê de ética em pesquisa do hospital universitário Lauro Wanderley da Universidade Federal da Paraíba, presente na íntegra no Anexo I neste trabalho. (CAE: 17813013.8.0000.5183).

4.5 Marcação de *Leishmania amazonensis* com CFSE

As formas promastigotas metacíclicas infectantes de *Leishmania amazonensis* (1×10^7 parasitas/mL) foram coradas com 5(6)-Éster de carboxifluoresceína succinimidil (CFSE). A solução de CFSE foi adicionada aos parasitas em uma concentração final de 5 μ M. A suspensão foi incubada por 15 minutos em B.O.D. a 26°C e lavadas 3 vezes em tampão PBS 1 X para retirada do excesso de CFSE aos parasitas não fixados. Em seguida, os parasitas foram ressuspensos em meio Schneider® e as células do sangue periférico foram infectadas com 10 parasitas/célula. O período de infecção foi de 3 horas com agitação dos tubos de 30 em 30 minutos para os leucócitos não precipitarem. Durante o tempo de infecção as células foram mantidas a 5% de CO₂, à 37°C. Posteriormente, as células foram lavadas três vezes com PBS 1X, à 1200 rpm, 10 minutos, 4°C.

4.6 Análise da influência da quercetina na taxa de infecção em monócitos

Foram coletadas células sanguíneas de indivíduos saudáveis (n=3) conforme descrito acima. O sangue coletado foi mantido em diferentes condições de cultura em estufa de CO₂ a 37°C. As condições foram as seguintes: Células sanguíneas infectadas por *Leishmania* marcadas com CFSE não tratadas (controle negativo), células sanguíneas infectadas por *Leishmania* marcadas com CFSE na presença do flavonoide quercetina em concentrações pré-estabelecidas, células sanguíneas infectadas por *Leishmania* na presença de Anfotericina B.

A infecção de monócitos por *L. amazonensis* marcadas com CFSE foi realizada na proporção de 1:10 num tempo de 3 horas. As células foram mantidas em cultura em estufa de CO₂ à 37°C. Após a infecção, foram adicionadas as substâncias testadas. A concentração da quercetina utilizada no tratamento das células do sangue total foi a sua concentração inibitória média, elucidada em experimentos realizados pelo nosso grupo de estudo que é 740,39 μ M (Tabela 1). Usamos a concentração do CI₅₀ uma vez, CI₅₀

duas vezes e CI_{50} quatro vezes, nas culturas de leucócitos juntamente com as substâncias. A incubação de 24 horas foi realizada em estufa de CO_2 à $37^\circ C$. Os controles DMSO (negativo), e Anfotericina B (positivo) foram utilizados, a anfotericina B também foi testada de acordo com a sua concentração inibitória média, $0,17 \mu g/ml$. Para a marcação de monócitos foi adicionado o anticorpo antimarcador de superfície CD14, já diluído, conforme titulação padronizada na fase de padronização dos reagentes, num volume final de $40 \mu L$. Após adição do anticorpo, a placa foi incubada a $4^\circ C$ por 15 minutos ao abrigo da luz. Terminado o período de incubação, foi realizada a lavagem das células, adicionando $150 \mu L$ de tampão PBS gelado em cada poço. A placa foi então, centrifugada durante 10 minutos a $4^\circ C$. Ao final da centrifugação, a placa foi vertida para retirar o sobrenadante e, em seguida, a placa foi agitada a fim de suspender as células. De posse das células já ressuspensas, foram adicionados $100 \mu L$ de tampão PBS 1X e $100 \mu L$ de solução de formaldeído 4%, para então realizar a leitura no citômetro de fluxo. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

4.7 Determinação da citotoxicidade

Para avaliação do tipo de morte celular por citometria de fluxo, utilizou-se a dupla marcação por Anexina V-FITC/Iodeto de Propídio (IP) (FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit - BD Biosciences, San Jose, CA, EUA), seguindo as instruções do fabricante. Formas promastigotas (1×10^6) em fase logarítmica de crescimento foram expostas às concentrações de 1x, 2x e 4x os valores de CI_{50} da quercetina e anfotericina B, utilizada como controle positivo, por 4 h a $26 \pm 1^\circ C$. Após o tempo de tratamento, as formas promastigotas foram lavadas três vezes em PBS gelado e ressuspensas em $100 \mu L$ de tampão de ligação à anexina (10 mM HEPES, 140 mM NaCl, e 2,5 mM $CaCl_2$, pH 7,4). Em seguida adicionou-se $2,5 \mu L$ de anexina V-FITC e as células foram incubadas por 15 minutos no escuro à temperatura ambiente. Após esse período, as células foram marcadas com IP ($5 \mu g/mL$) e avaliadas em citômetro de fluxo (BD FACSCanto[®] II - BD Biosciences, San Jose, CA, EUA). Para análise foram mensurados 30.000 células, utilizando o software FlowJo 10.0.7 (TreeStar Inc., Ashland, OR, EUA).

4.8 Ensaio de lise de glóbulos vermelhos

A coleta de amostras de sangue periférico humano (cerca de 10 mL) foi

realizada por punção de voluntários adultos e saudáveis (n=3), utilizando material estéril adquirido comercialmente (agulhas e seringas BD Plastipak® – BD Biosciences, San Jose, CA, EUA) e colhidos em tubos a vácuo (Greiner bione, Vacuette, Americana, SP, Brasil) contendo solução anticoagulante. Após a coleta, os eritrócitos foram diluídos em 80 µL de PBS, ajustando a concentração do sangue para 5% de hemácias. Em seguida foram adicionados a quercetina em concentrações pré-estabelecidas e a anfotericina B, fármaco de referência, em diferentes concentrações, diluídos num volume de 20 µL de PBS. Logo após, foram incubados durante 1 h à 37°C e a reação foi interrompida pela adição de 200 µL de PBS. Em seguida, as suspensões foram centrifugadas a 1000 rpm, por 10 min. a temperatura ambiente e o sobrenadante foi coletado e transferido para placas de 96 poços e mensurado em leitora de microplaca (550 nm). A ausência (controle negativo) e 100% de hemólise (controle positivo) foram determinadas, substituindo a solução de amostra testada com igual volume de PBS e água Milli-Q estéril (lise por choque hipotônico), respectivamente.

4.9 Análises Estatísticas

Todos os ensaios foram realizados em triplicata, em três experimentos independentes, e foram analisados com o auxílio do software GraphPad Prism 5.0 (San Diego, CA) e do programa SPSS (versão 13.0). A concentração mínima inibitória (CI₅₀) foi calculada usando curvas dose-resposta e intervalos de 95% de confiança foram incluídos. O valor de CI₅₀ (concentração da droga capaz de inibir o crescimento dos parasitas em 50%) foi calculado usando Regressão Probit e assumindo um nível de confiança de 95% (p < 0.05). Análise de variância (ANOVA) seguida por um Tukey foi realizada, tomando um valor de p < 0,05 como o nível mínimo necessário para a significância estatísticas.

5 RESULTADOS

5.1 Análise da atividade anti-*Leishmania* da quercetina, na viabilidade celular e inibição de crescimento nos tempos de 24, 48 e 72 horas.

Após a cultura de *L. amazonensis* foram realizadas diluições da quercetina obtendo concentrações de 2000 $\mu\text{M/mL}$, 1000 $\mu\text{M/mL}$, 500 $\mu\text{M/mL}$, 250 $\mu\text{M/mL}$, 100 $\mu\text{M/mL}$, e através do protocolo descrito anteriormente foi realizado o teste *in vitro* contra a proliferação de promastigotas de *L. amazonensis*. De acordo com os dados obtidos no teste *in vitro* do flavonoide quercetina contra as formas promastigotas de *L. amazonensis*, a porcentagem média de crescimento celular em 24h nas concentrações de 100 $\mu\text{M/mL}$, 250 $\mu\text{M/mL}$, 500 $\mu\text{M/mL}$, 1000 $\mu\text{M/mL}$, 2000 $\mu\text{M/mL}$, foram respectivamente 89,34%, 86,04%, 84,82%, 74,96%, e 63,11% e o controle positivo apresentou uma porcentagem média de 63,45%. Nota-se que apenas a concentração de 2000 $\mu\text{M/mL}$ apresentou porcentagem média inferior de crescimento de *L. amazonensis* em relação ao controle positivo, o Glucantime[®], fármaco de referência utilizado no tratamento da leishmaniose tegumentar americana. Consequentemente, a concentração mais baixa, de 100 $\mu\text{M/mL}$, apresentou maior porcentagem de crescimento de *L. amazonensis* (Figura 9).

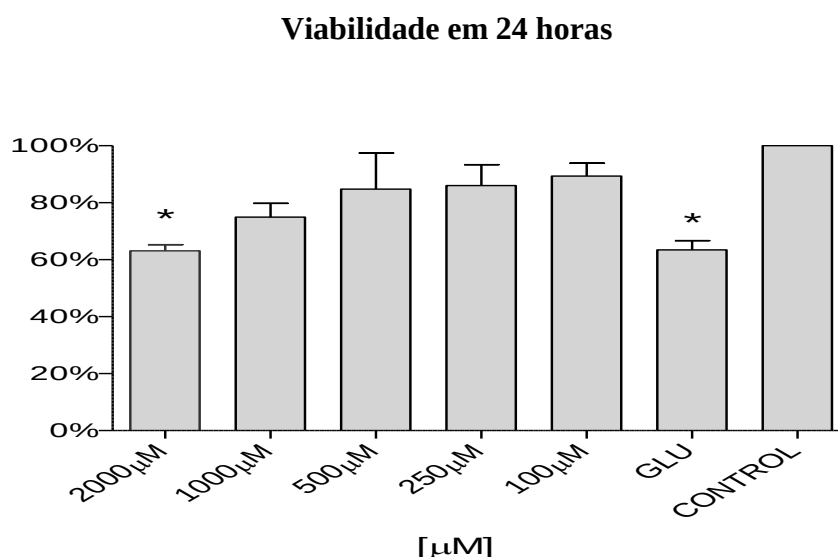


Figura 9: Porcentagem média de viabilidade celular de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* na presença de diferentes concentrações da quercetina. A inibição do crescimento dos parasitas foi avaliada em Câmara de Neubauer após 24 h de tratamento. O gráfico representa a média $\pm$

erro padrão da média de três experimentos independentes, considerando o controle como 100% de viabilidade. Foi realizado *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparar a inibição observada na presença das diferentes concentrações ao grupo controle (DMSO 0,5% em meio Schneider completo). O gráfico representa a porcentagem média de um experimento realizado em triplicata.* $p < 0,05$, comparado ao controle positivo. Fonte: Autor, 2016.

Observando os dados obtidos após 48 h, a porcentagem média de crescimento celular nas concentrações de 2000 $\mu\text{M/mL}$, 1000 $\mu\text{M/mL}$, 500 $\mu\text{M/mL}$, 250 $\mu\text{M/mL}$, 100 $\mu\text{M/mL}$ foram respectivamente, 51,48%, 51,22%, 68,21%, 71,07% e 84,68%. O controle positivo Glucantime[®] apresentou uma porcentagem média de 52,25%. Observou-se que o crescimento de *L. amazonensis* nas maiores concentrações que foram analisadas (1000 $\mu\text{M/ml}$ e 2000 $\mu\text{M/ml}$) e o controle positivo (Glucantime[®]) apresentaram porcentagens médias similares de crescimento (Figura 10).

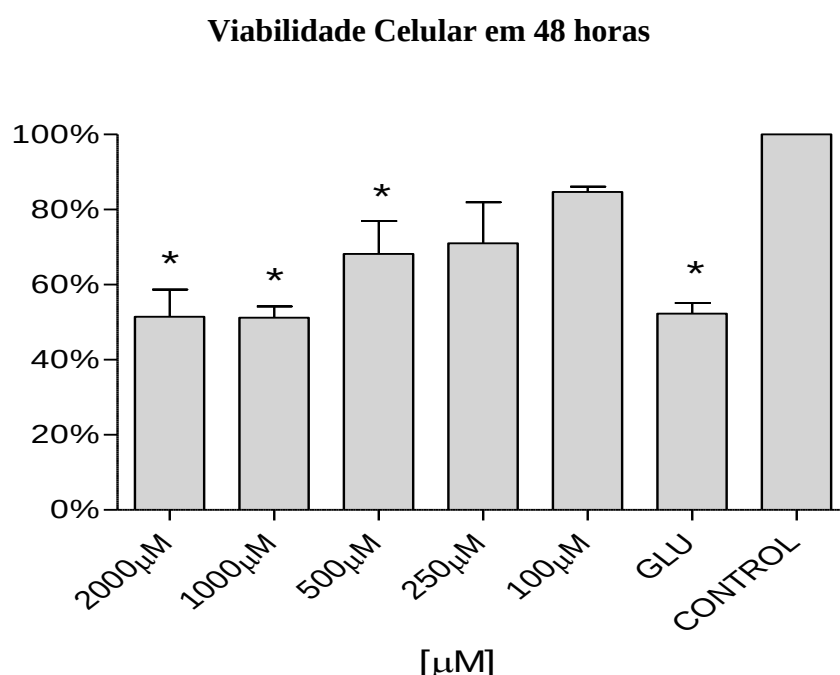


Figura 10: Porcentagem média de viabilidade celular de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* na presença de diferentes concentrações da quercetina. A inibição do crescimento dos parasitas foi avaliada em Câmara de Neubauer após 48 h de tratamento. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes, considerando o controle como 100% de viabilidade. Foi realizado *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparar a inibição observada na presença das diferentes concentrações ao grupo controle (DMSO 0,5% em meio Schneider completo). O gráfico representa a porcentagem média de um experimento realizado em triplicata.* $p < 0,05$, comparado ao controle positivo. Fonte: Autor, 2016.

Após 72 h do teste *in vitro* a porcentagem média de crescimento celular nas concentrações de 2000 $\mu\text{M/mL}$, 1000 $\mu\text{M/mL}$, 500 $\mu\text{M/mL}$, 250 $\mu\text{M/mL}$, 100 $\mu\text{M/mL}$ foram respectivamente, 27,69%, 44,44%, 54,33%, 49,92% e 83,07%. O controle positivo Glucantime[®] apresentou uma porcentagem média bem acentuada de 8,89%. A quercetina apresentou um maior efeito tóxico sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* nas concentrações de 2000 $\mu\text{M/ml}$, 1000 $\mu\text{M/ml}$, 500 $\mu\text{M/ml}$, e 250 $\mu\text{M/ml}$ e o controle positivo (Glucantime[®]) apresentou a porcentagem média mais baixa na análise de 72h, assim como em comparação com os tempos anteriores, no crescimento de *L. amazonensis* (Figura 11).

Os resultados obtidos a partir da análise dos dados relacionados à viabilidade celular das formas promastigotas de *L. amazonensis*, sobre o efeito da quercetina e do Glucantime[®] mostraram que houve uma redução no número de parasitas com o aumento do tempo de incubação. Na análise realizada após 72 h do início do teste *in vitro* o efeito da quercetina sobre o parasita foi mais relevante (Figura 12).

Viabilidade Celular em 72 horas

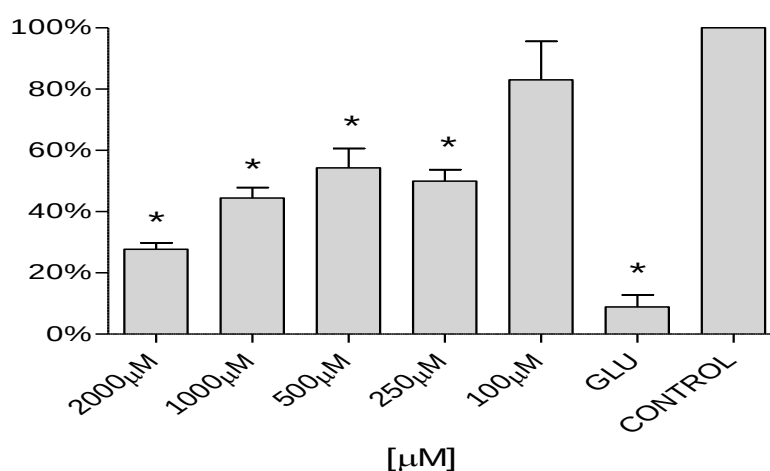


Figura 11: Porcentagem média de viabilidade celular de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* na presença de diferentes concentrações da quercetina. A inibição do crescimento dos parasitas foi avaliada em Câmara de Neubauer após 72 h de tratamento. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes, considerando o controle como 100% de viabilidade. Foi realizado *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparar a inibição observada na presença das diferentes concentrações ao grupo controle (DMSO 0,5% em meio Schneider completo). O gráfico representa a porcentagem média de um experimento realizado em triplicata.* $p < 0,05$, comparado ao controle positivo. Fonte:Autor, 2016.

Viabilidade Celular

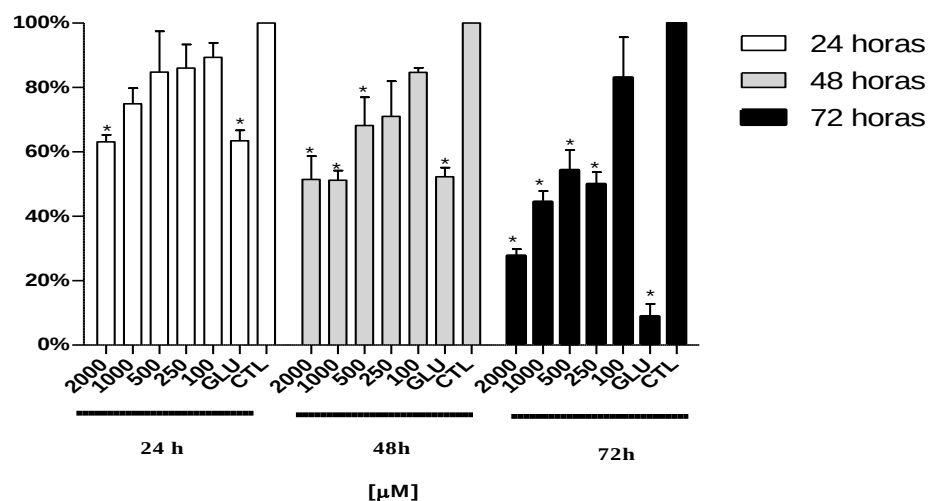


Figura 12: Porcentagem média de crescimento de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* na presença de diferentes concentrações da quercetina após 24, 48 e 72h. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes, considerando o controle como 100% de viabilidade. Foi realizado One-way ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparar a inibição observada na presença das diferentes concentrações ao grupo controle (DMSO 0,5% em meio Schneider completo). O gráfico representa a porcentagem média de um experimento realizado em triplicata. * $p < 0,05$, comparado ao controle positivo. Fonte: Autor, 2016.

Tabela 1: Resultado do IC_{50} da atividade anti-*Leishmania* da quercetina. Fonte: Autor, 2016.

Substância	Tempo (horas)	Promastigotas
		CI_{50} µM/ mL
Quercetina	24	740,39
	48	624,33
	72	15,9

Além do ensaio de contagem de *Leishmania* em câmara de Neubauer também foi realizado o ensaio de MTT, como descrito na metodologia. De acordo com os dados obtidos no teste *in vitro* de MTT do flavonoide quercetina contra as formas

promastigotas de *L. amazonensis*, os resultados demonstraram que nas concentrações de 125 $\mu\text{M/mL}$, 250 $\mu\text{M/mL}$, 500 $\mu\text{M/mL}$, 1000 $\mu\text{M/mL}$, 2000 $\mu\text{M/mL}$, as porcentagens médias de crescimento celular foram respectivamente 71,23%, 65,63%,61,04%,59,13%, 54,11% e o controle positivo que foi a Anfotericina B, apresentou uma porcentagem média de 12,93% (Figura 13). Nota-se que mesmo na maior concentração do flavonoide que foi a de 2000 $\mu\text{M/mL}$ ele apresentou uma maior porcentagem média de crescimento em relação a Anfotericina B fármaco de referência utilizado no tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana. Fonte: Autor,2016.

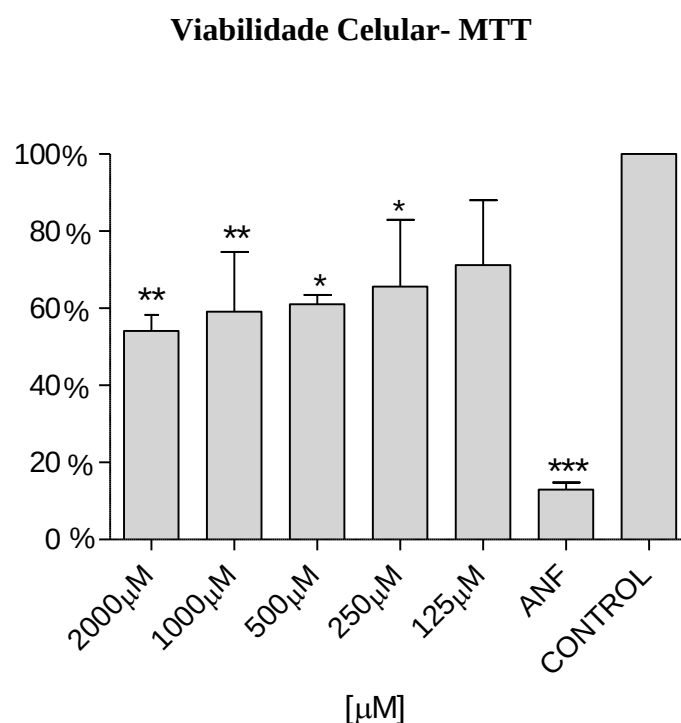


Figura 13: Porcentagem média de crescimento de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* na presença de diferentes concentrações da quercetina. A citotoxicidade dos parasitas foi avaliada pelo método de redução do 3-[4,5-dimetiltiazol-2-il-2,5-difeniltetrazolium brometo (MTT) após 72 h de tratamento. O gráfico representa a média $\pm$ erro padrão da média de três experimentos independentes, considerando o controle como 100% de viabilidade. Foi realizado *One-way* ANOVA seguido pelo pós-teste de Tukey para comparar a inibição observada na presença das diferentes concentrações ao grupo controle (DMSO 0,5% em meio Schneider completo), sendo * $p < 0,05$, ** $p < 0,001$ e *** $p < 0,0001$, comparado ao controle positivo. Fonte: Autor, 2016.

5.2 Análise da influência do flavonoide quercetina na taxa de infecção de monócitos por *L. amazonensis*.

Após a cultura de *L. amazonensis*, foi coletado o sangue total de indivíduos não infectados, e através dos protocolos descritos anteriormente foi realizada a infecção *in vitro* de monócitos pela *L. amazonensis*. A Figura 14 representa a marcação de monócitos infectados por *L. amazonensis*, onde é observado em A o perfil de tamanho x granulosidade, em B a marcação de CD14 em monócitos, em C monócitos infectados por *Leishmania* marcada com CFSE e em D em vermelho nós temos monócitos não infectados com *L. amazonensis* e, em azul, monócitos infectados com o parasita marcados com o CFSE. Ao visualizar o resultado, foi notado que as células tratadas com quercetina apresentaram uma relevante queda na frequência de infecção quando comparada com as células não tratadas. Outro resultado encontrado evidencia o descrito anteriormente, quando foi feita a comparação da taxa de infecção causada pelo parasita na presença do flavonoide com a taxa de infecção na presença da anfotericina B (Figura 15), observou-se então que a quercetina diminui significativamente a entrada dos parasitas nos monócitos comparada ao fármaco que é atualmente administrado no tratamento de pacientes com leishmaniose.

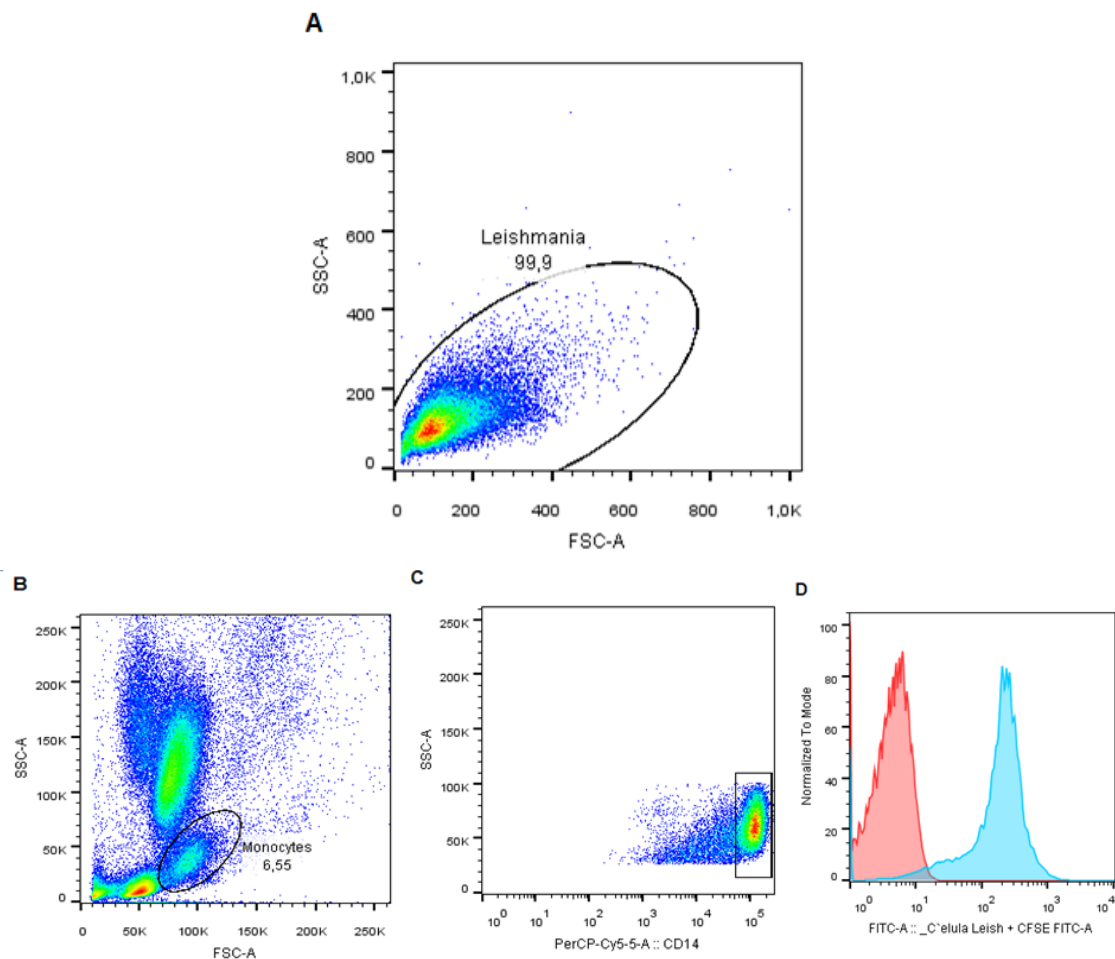


Figura 14: Perfil da distribuição de células do sangue total infectadas com *L. amazonensis* no gráfico de tamanho x granulosidade. (A) Perfil da distribuição de células do sangue total no gráfico de tamanho x granulosidade, aonde foi feito um "gate" nos monócitos (B). Gráfico mostrando a caracterização dos monócitos com o CD14(marcador de monócitos) CD14 x granulosidade (C), CD14 marcador de monócitos. Taxa de infecção da *Leishmania amazonensis* em monócitos (D). Em vermelho podemos ver a células não infectadas por *L. amazonensis* e, em azul visualizamos os monócitos infectados por *L. amazonensis* marcada com CFSE. Fonte: Autor, 2016.

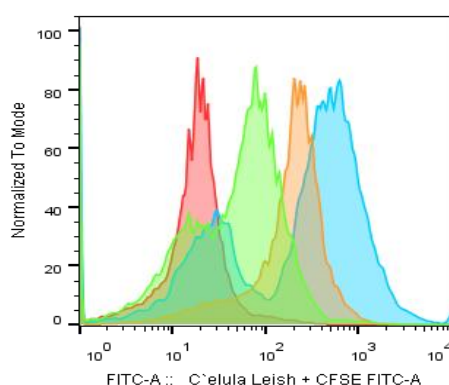


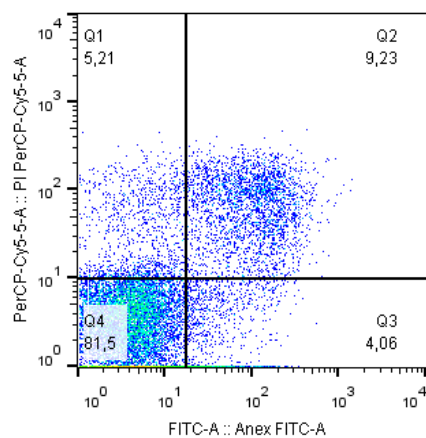
Figura 15: Taxa de infecção da *L. amazonensis* nos monócitos, nas células do sangue total sem o tratamento, com a anfotericina B ou com a quercetina. Foi realizado o contraste da frequência de infecção nos monócitos infectados pelo parasita, com o tratamento com o flavonoide e com a anfotericina B[®]. Em verde, temos os monócitos infectados com *L. amazonensis* tratados com uma concentração de 4xCI₅₀ da quercetina, em laranja os monócitos parasitados tratados com uma concentração de 1xCI₅₀ do flavonoide. Por fim, em azul estão os monócitos tratados com a concentração de 1xCI₅₀ da anfotericina B[®], que foi utilizada como controle positivo nesse estudo e, em vermelho os monócitos infectados sem o tratamento de ambas as drogas. Fonte: Autor, 2016.

5.3 Determinação do perfil apoptótico e necrótico em formas promastigotas de *L. amazonensis* causado pelo tratamento com a quercetina

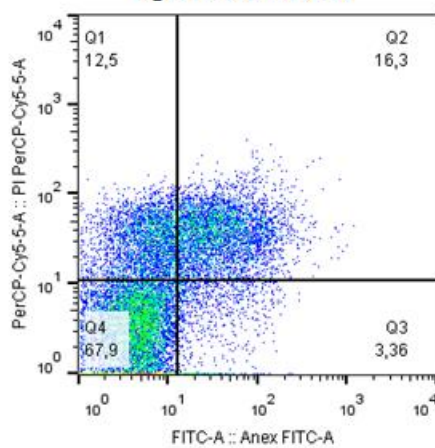
Para indicar a frequência de morte celular dos parasitas expostos à quercetina e à Anfotericina B foi realizada a citometria de fluxo convencional, utilizando os marcadores celulares Anexina V-FITC e IP. *Dot-plots* de AnexinaV-FITC/IP estão representados na Figura 16. Nas células que não foram submetidas ao tratamento nem com a Anfotericina B nem com a quercetina (Anexina V-FITC⁻/PI⁻), as proporções de *Leishmania* que não apresentaram apoptose inicial, tardia e necrose foi de 81,5% e, a frequência média dos parasitas que entraram em apoptose inicial, tardia e necrose, foi de 4,06% , 9,23% e 5,21% , respectivamente. Os resultados dos tratamentos com quercetina em formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* são apresentados a seguir. O flavonoide apresentou efeito citotóxico sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*, com percentagens de 3,36%, 16,3% e 12,5% apoptose inicial, apoptose tardia e necrose respectivamente, na concentração de 1xCI₅₀ (Tabela 2). Quando a concentração do flavonoide usada foi de 2xCI₅₀ (Tabela 2), foi observado um perfil citotóxico diferente do anterior, aonde as percentagens foram de 6,12% , 15,7% e 9,37% , apoptose inicial , apoptose tardia e necrose , na devida ordem. A maior concentração

administrada para realização desse experimento foi o de $4xCI_{50}$ da substância (Tabela 2), e essa foi a concentração que mostrou maior porcentagem de necrose das células com um total de 15,9%, os valores de apoptose inicial e tardia mantiveram-se padrões comparado a concentração utilizada anteriormente, 6,54% e 15,6% , respectivamente. O controle positivo utilizado nesse experimento foi a anfotericina B, cujo mecanismo de ação já foi elucidado e sua concentração inibitória de crescimento é 0,17 μ g/ml. Ao comparar a porcentagem de morte celular causada pela ação da Anfotericina B e do flavonoide quercetina, observamos que a quercetina atividade diferente se comparada a esse medicamento de referência, os valores da porcentagem da Anfotericina B na concentração de $1xCI_{50}$, foi de 5,70% , 24,1% e 2,9% , para apoptose inicial , apoptose tardia e necrose , na devida ordem. Já nas concentrações maiores de $2xCI_{50}$ e $4xCI_{50}$, a Anfotericina B se mostrou relativamente mais citotóxica comparada ao flavonoide. As porcentagens verificadas da concentração de $2xCI_{50}$ foram de: 8,32%, 40,3% e 6,08%, para apoptose inicial , tardia e necrose , respectivamente. Finalmente, na concentração de $4xCI_{50}$, notou-se o evidente aumento nas porcentagens de apoptose inicial, tardia e necrose, aonde as porcentagens foram de 7,34%, 47,0% e 11,0% de modo respectivo (Tabela 2).

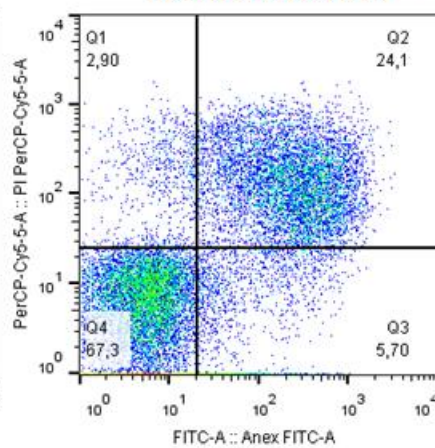
CONTROLE



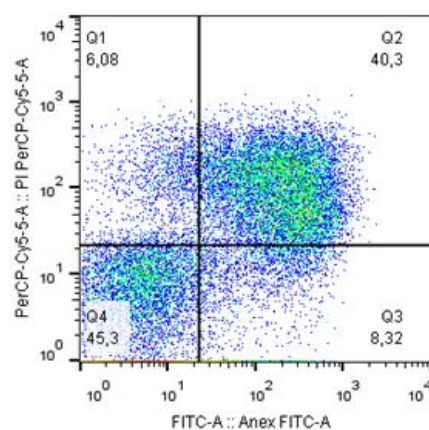
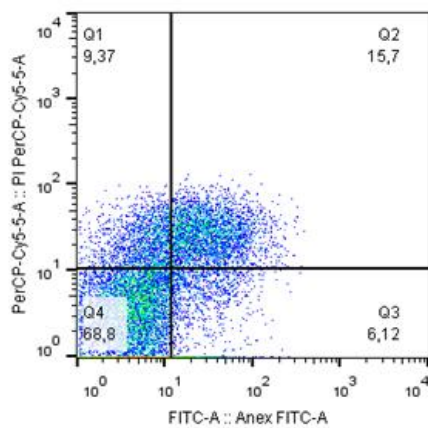
QUERCETINA



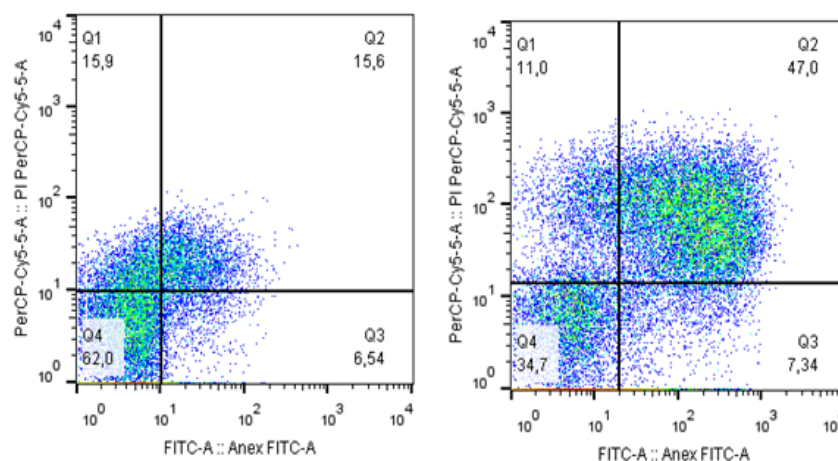
ANFOTECINAB®



1xCI₅₀



2xCI₅₀



4xCI₅₀

Figura 16: *L. amazonensis* tratadas ou não com a quercetina, ou com a anfotericina B. Perfil apoptótico observado em *L. amazonensis*, durante exposição de 24 horas ao flavonoide e ao controle positivo (anfotericina B). Foi avaliada a citotoxicidade do flavonoide e da anfotericina B, observando as frequências de apoptose inicial, tardia e necrose.. A anfotericina B foi utilizada com controle positivo, e foi usada nas mesmas concentrações que o flavonoide (1 x CI₅₀, 2 X CI₅₀ e 4 X o CI₅₀), para assim ser feita uma comparação da citotoxicidade de ambas as substâncias. Fonte: Autor, 2016.

Tabela 2: Análise de morte celular de formas promastigotas de *L. amazonensis* tratados e não tratados com quercetina e a, Anfotericina B por citometria de fluxo. Mostrando a porcentagem de Anexina V, Anexina V/IP e, IP. Fonte: Autor, 2016.

Frequência de morte celular de <i>L. amazonensis</i> (% células)			
	Anexina V	Anexina/IP	IP
Controle	4,06	9,23	5,21
Quercetina	3,36	16,3	12,5
1xCI₅₀			
Quercetina	6,12	15,7	9,37
2xCI₅₀			
Quercetina	6,54	15,6	15,9
4xCI₅₀			
Anf B 1xCI₅₀	5,70	24,1	2,9
Anf B 2xCI₅₀	8,32	40,3	6,08
Anf B 4xCI₅₀	7,34	47,0	11,0

5.4 Avaliação do ensaio de glóbulos vermelhos

Outros modelos de citotoxicidade foram investigados para determinar a segurança e confiabilidade de novos compostos com possível atividade leishmanicida. Avaliações de citotoxicidade usando glóbulos vermelhos representam um modelo *in*

vitro que é correlacionado com danos celulares *in vivo* baseados em lesão ou formação de poros na membrana plasmática. Desse modo, foi avaliado a citotoxicidade da quercetina contra os glóbulos vermelhos de humanos. Os resultados mostraram que o nível de segurança desse flavonoide é muito elevado visto que ele mostrou uma menor porcentagem de hemólise >2000 μ M (Tabela 3).

Tabela 3: Efeito citotóxico da quercetina e da Anfotericina B em células vermelhas de humanos.

Fonte: Autor, 2016.

Substância	Citotoxicidade Glóbulos Vermelhos
	HC ₅₀ μ M/ mL
Quercetina	>2000

6 DISCUSSÃO

Uma grande parte da população que vive em áreas rurais não tem acesso fácil a tratamentos convencionais devido à disponibilidade limitada de serviços de saúde. Portanto, as plantas podem fornecer uma fonte importante e necessária de medicamentos e compostos terapêuticos. Os efeitos adversos provenientes do uso das drogas atualmente disponíveis para o tratamento das leishmanioses têm motivado a busca por novos agentes terapêuticos, que possam ser mais eficazes sozinhos ou concomitante com as terapias atuais contra a doença. Devido a esse apelo, compostos sintéticos ou aqueles que são oriundos de plantas medicinais vem sendo extensivamente avaliados com a pretensão de se observar neles uma atividade leishmanicida, devido a necessidade urgente de se descobrir novos agentes terapêuticos mais eficazes e menos tóxicos do que os medicamentos convencionais para o tratamento da leishmaniose (L.A. DUTRA, L. DE ALMEIDA, PASSALACQUA T.G. *et al.*, 2014).

Flavonas e seus derivados, os flavonoides, estão entre os derivados de plantas mais atraentes que podem enriquecer as opções terapêuticas atuais, devido à extrema gama de propriedades biológicas (RAMÍREZ-MACÍAS *et al.*, 2012). Os flavonoides possuem diversas atividades biológicas, incluindo atividade antioxidantes, anti-hipertensiva, atividade anti-inflamatória, antimicrobiana e antiprotozoário. A quercetina é um flavonoide que se encontra abundante na natureza e que recentemente tornou-se um composto de importante interesse farmacêutico por apresentar uma vasta gama de atividades terapêuticas. Uma dessas atividades é a ação da quercetina no parasita *Trypanosoma brucei* e nas formas amastigotas de *Leishmania donovani* (TASDEMIR D.; KAISER M.; BRUN R.; YARDLEY V.; SCHMIDT T.J.; *et al.*, 2006). E a sua ação anti-*Leishmania* já foi relatada em estudos anteriores, para algumas espécies do gênero *Leishmania*, em formas promastigotas e amastigotas intracelulares desse parasita (MITTRA *et al.*, 2000; TASDEMIR *et al.*, 2006; SEN *et al.*, 2008; GUNDAMPATI *et al.*, 2014).

A partir dos dados obtidos nesse trabalho, pode-se observar que a quercetina, apresentou atividade anti-*Leishmania* contra formas promastigotas do parasita em testes *in vitro*. Ao observar os dados relativos à porcentagem média da viabilidade celular em 24 h, notou-se que somente a concentração de 2000 µM/ml apresentava porcentagem média inferior de crescimento de *L. amazonensis* em relação ao controle positivo, o Glucantime[®], fármaco de referência no tratamento das leishmanioses. Após 48 h observou-se que o crescimento de *L. amazonensis* nas maiores concentrações que

foram analisadas (1000 $\mu\text{M/ml}$ e 2000 $\mu\text{M/ml}$) e o controle positivo (Glucantime[®]) apresentaram porcentagens médias similares de crescimento neste período e o Glucantime e as concentrações de 1000 e 2000 $\mu\text{M/ml}$ possuem efeito citotóxicos semelhantes. Na última contagem, após 72 h a quercetina apresentou um efeito citotóxico sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis* nas concentrações de 2000 $\mu\text{M/ml}$, 1000 $\mu\text{M/ml}$, 500 $\mu\text{M/ml}$, e 250 $\mu\text{M/ml}$, e o controle positivo apresentou a porcentagem média ainda mais baixa, assim como em comparação com os tempos anteriores, no crescimento de *L. amazonensis*. Ao observar os dados obtidos em 24, 48 e 72 h, pode-se concluir que taxa de sobrevivência das promastigotas diminuiu com o aumento do tempo de exposição ao flavonoide e ao Glucantime[®]. Apesar do efeito do flavonoide contra a proliferação de promastigostas, o fármaco de primeira escolha no tratamento da leishmaniose tegumentar americana apresentou maior eficácia.

Os resultados demonstram que o Glucantime[®] obteve maior eficácia na inibição do crescimento parasitário. Acredita-se que o mecanismo de ação dos antimoniais é baseado na interferência do processo bioenergético das formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania*. Os produtos desta interferência bloqueiam e inibem diferentes proteínas do parasita, particularmente enzimas envolvidas na glicólise e oxidação de ácidos graxos, resultando numa redução na produção de ATP e GTP, que são primordiais para o funcionamento celular (CHAN-BACAB; PENA-RODRIGUEZ, 2001).

Em relação a citotoxicidade da quercetina as formas promastigotas de *L. amazonensis*, foi analisada a *L. amazonensis* sem o tratamento com a quercetina, e com a anfotericina B, para que fosse feita a comparação da citotoxicidade de ambas as substâncias. Assim, observou-se que houve uma maior porcentagem de morte celular quando foi utilizada uma maior concentração do flavonoide 4x IC_{50} da substância. Como controle positivo nesse experimento utilizou-se a anfotericina B, cujo mecanismo de ação já foi elucidado. A anfotericina B, é um antibiótico poliênico e que também tem atividade leishmanicida, atua tanto sobre formas promastigotas e amastigotas do parasita *Leishmania* e tem como alvo o ergosterol na membrana de superfície do parasita, levando a um aumento da permeabilidade e o influxo de íons (ELLIS M.; BERNSEN R.; ALI-ZADEH H, *et al.*, 2009). Ao comparar a porcentagem de morte celular causada pela ação da anfotericina B e do flavonoide quercetina, observou-se que a quercetina se mostrou menos tóxica se comparada a anfotericina B. Em relação a influência do tratamento com a quercetina sob a taxa de infecção dos monócitos pelos

parasitas, observou-se que as células tratadas com quercetina apresentaram uma relevante queda na frequência de infecção quando comparada com as células não tratadas. Outro resultado encontrado evidencia o descrito anteriormente, quando comparamos a taxa de infecção causada pelo parasita na presença do flavonoide com a taxa de infecção na presença da Anfotericina B, observou-se que a quercetina diminui a entrada dos parasitas nos monócitos comparada ao fármaco que é atualmente administrado no tratamento de pacientes com leishmaniose. Os compostos naturais, tais como os flavonoides em estudos posteriores mostraram atividade relacionadas a infecção de leishmanias em macrófagos (MUZITANO *et al.*, 2006; TASDEMIR *et al.*, 2006). Quando testada contra *L. (L.) donovani*, a quercetina reduziu a carga amastigota intracelular em 70% usada em uma concentração de 45 μ M (MITTRA *et al.*, 2000). A planta *Kalanchoe pinata*, que contém quercetina, quercitrina e outros flavonoides, mostrou atividade contra as formas clínicas cutânea e a visceral (MUZITANO *et al.*, 2009).

Outros modelos de citotoxicidade também foram avaliados nesse trabalho para determinar a garantia de segurança do uso da quercetina com uma potencial atividade leishmanicida (VALADARES D.G.; DUARTE M.C. *et al.*, 2011). Avaliações de citotoxicidade usando glóbulos vermelhos representam um modelo *in vitro* que é correlacionado com base em lesão ou formação de poros na membrana plasmática.(RODRIGUES K.A. ; L.V. AMORIM *et al.*, 2014). Dessa forma, a citotoxicidade da quercetina também foi avaliada em glóbulos vermelhos humanos, viu-se que a quercetina não apresentou citotoxicidade para glóbulos vermelhos mesmo na maior concentração utilizada nesse trabalho que foi a de 2000 μ M/ml. Em oposição, estudos realizados anteriormente mostraram que a anfotericina B e o Glucantime[®], ambos fármacos de referência utilizados atualmente no tratamento da leishmaniose, apresentam citotoxicidade em concentrações muito menores (RODRIGUES K.A.; DIAS C.N.; NÉRIS P.L. *et al.*, 2015).

Sabe-se que a quercetina por ser um flavonoide, pode inibir o processo de formação de radicais livres em três etapas diferentes, na iniciação (pela interação com íons superóxido), na formação de radicais hidroxil (por quelar íons de ferro) e na peroxidação lipídica (por reagir com radicais peroxi de lipídeos). Embora os flavonoides apresentem propriedades antioxidantes importantes na prevenção de doenças, alguns estudos têm demonstrado uma atividade pró-oxidante *in vitro*. Relatos de mutagenicidade baseada no dano oxidativo causado pelos flavonoides tornou-se de

grande interesse (BEHLING *et al.*, 2004). Os resultados mostrados nesse trabalho demonstram que a quercetina por ser um flavonoide e consequentemente um composto antioxidante, tem um importante mecanismo de ação a ser melhor elucidado, que influencia na taxa de infecção dos parasitas. Conclui-se assim, que esse fármaco pode ser utilizado como uma droga concomitante ao tratamento com os antimonais pentavalentes e com a anfotericina B, isto é, fármacos mais administrados nos pacientes atualmente, propondo que essa substância pode auxiliar na diminuição da infecção pela *L. amazonensis*.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados desse estudo pode-se concluir que a quercetina é um composto parcialmente ativo na espécie *L. amazonensis*, apresentando baixa atividade em comparação com a anfotericina B e Glucantime[®], que são os fármacos de referência amplamente utilizados no tratamento da doença. Este estudo também demonstrou que a quercetina diminuiu a taxa de infecção causada pelos parasitos, comparada a um dos fármacos de referência. É necessário que mais trabalhos sejam realizados na área visando os mecanismos de ação da quercetina e investigações *in vivo*. Portanto, a quercetina se mostrou um potencial agente no tratamento das leishmanioses, visto que ela não apresentou toxicidade aos glóbulos vermelhos humanos. Estudos de mecanismos de infecção deverão ser conduzidos para maiores esclarecimentos sobre a ação da quercetina como possível facilitador do tratamento da doença.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ALCOLEA, P.J.; ALONSO, A.; GÓMEZ, M.J.; SÁNCHEZ-GOROSTIAGA A.; MORENO-PAZ, M.; GONZÁLEZ-PASTOR, E.; TORAÑO A.; PARRO V.; LARRAGA, V. Temperature increase prevails over acidification in gene expression modulation of amastigote differentiation in *Leishmania infantum*. **BMC Genomics**, v. 14, p. 11:31, 2010.

ALVAR, J.; VÉLEZ I.D.; BERN C.; HERRERO M.; DESJEUX P.; CANO J.; JANNIN J.; BOER, M.; Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, p. e35671, 2012.

AMEEN, M. Cutaneous leishmaniasis: advances in disease pathogenesis, diagnostics and therapeutics. **Clin. Exp. Dermatol**, v. 35, n. 7, p. 699-705, 2010.

ARABBI, P. R.; GENOVESE, M. I.; LAJOLO, F. M. Flavonoids in vegetable foods commonly consumed in Brazil and estimated ingestion by the Brazilian population. **J. Agric. Food Chem.**, v.52, p.1124-1131, 2004.

ARAÚJO, C.A.C.; ALEGRIO L.V.; LEON L.L. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrolobium sclerophyllum*. **Phytochemistry** 49:751-754, 1998.

ASHUTOSH; SUNDAR, S.; GOYAL, N. Molecular Mechanisms of Antimony Resistance In *Leishmania*. **J. Med. Microbiol**, v. 56 (PT 2), p. 143-1453, 2007.

ASILIAN, A.; JALAYER, T.; NILFOROOSHZADEH, M.; GHASSEMI, R.L.; PETO R.; WAYLING, S.; OLLIARO, P.; MODABBER, F. Treatment of cutaneous leishmaniasis with aminosidine (paromomycin) ointment: double-blind, randomized trial in the Islamic Republic of Iran. **Bull World Health Organ**, v. 81, n.5, p. 353-359, 2003.

BAILEY, M.S.; LOCKWOOD, D.N.J. Cutaneous leishmaniasis. **Clinics in Dermatology**, v. 25, p. 203–221, 2007.

BAÑULS, A.L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. **Adv. Parasitol**, v. 64, p. 1-109, 2007.

BARATA, L.E.S., SANTOS L.S. FERRI, H.P.; PHILLIPSON, J.D.; PAINE, A.; CROFT, L.S. Anti-leishmanicidal activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. **Phytochemistry** 55: 589-595, 2000.

BARONI, A. AIELLO, F.S.; VOZZA A.; VOZZA, G.; FACCENDA F.; BRASIELLO M.; RUOCCO E. Cutaneous leishmaniasis treated with itraconazole. **Dermatol. Ther**, v. 22, Suppl 1, p. S27-S29, 2009.

BASANO, S.A.; CAMARGO, L.M.A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev. Bras. Epidemiol**, v. 7, n. 3, p. 328-337, 2004.

BATES, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sandflies. **Int. J. Parasitol**, v. 37, n. 10, p. 1097-106, 2007.

BEHLING, E. B.; SENDÃO M. C. *et al.* Flavonoide Quercetina: Aspectos Gerais e Ações Biológicas. **Alimentos e Nutrição** V 15, n. 3, p. 285-292, 2004.

BISCHOFF, S.C. Quercetin: potentials in the prevention and therapy of disease. **Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care**, 2008, 11, 733-40.

BLUM, J.A.; HATZ, C.F. Treatment of cutaneous leishmaniasis in travelers 2009. **J. Travel Med**, v. 16, n. 2, p. 123-131, 2009.

BOECK, P.; FALCÃO, C.A.B.; LEAL, P.C.; YUNES R.A.; FILHO, V.C.; TORRES-SANTOS E.C.; ROSSI-BERGMANN, B. Synthesis of chalcone analogues with increased antileishmanial activity. **Bioorg. Med. Chem.** 14: 1538-1545, 2006.

BRASIL. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: Editora MS, 2ª Ed.atualizada, 2010. Disponível em:http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_americana.pdf. Último acesso em: 25/05/2016.

BUCKI, R.; PASTORE, J.J.; GIRAUD, F., SULPICE, J.C.;JANMEY P.A. Flavonoid inhibition of platelet proagulant activity and phosphoinositide synthesis. **J. Thromb. Haemost.**, v.1, p.1820-1828, 2003.

CARVALHO, P.B.; FERREIRA E. Leishmaniasis phytotherapy.Nature's leadership against na ancient disease. **Fitoterapia** 72 : 599-618,2001.

CHAKRAVARTY, J.; SUNDAR, S. Drug resistance in leishmaniasis. **J. Glob. Infect. Dis**, v.2, n. 2, p.167-176, 2010.

CHAN-BACAB, M. J.; PENA-RODRÍGUEZ, L. M. **Plant natural products with leishmanial activity**. The Royal Society of Chemistry, v. 18, p. 674-688, 2001.

CHEN, M. ;CHRISTENSEN S.B.; BLOM, J.; LEMMICH, E.; NADELMANN, L. FICH, K.; THEANDER, T.G.; KHARAZMI, A. Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of *Leishmania*. **Antimicrob. Agents. Ch.** 37: 2550-2556,2003.

CORRALES, R.M.; SERENO, D.; MATHIEU-DAUDÉ, F. Deciphering the *Leishmania* exoproteome: what we know and what we can learn. **FEMS Immunol. Med. Microbiol**, v. 58, n. 1, p. 27-38, 2010.

COSTA FILHO, A.V.; LUCAS, I.C.; SAMPAIO, R.N. Comparative study between oral miltefosine and parenteral N-metil glucamine antimoniate for the treatment of experimental leishmaniasis caused *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop**, v. 41, n. 4, p. 424-427, 2008.

COSTA, A.A.; SALDANHA, A.C.R.; B.M.C. ; RAMOS B.; IBRAIM A. J., NORONHA, A.L.L.; BÁFICA, A.; BARRAL A.; CORBETT, C.E.P. ; COSTA J.M.L. Imaging exams of bone lesions in patients with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). **Acta Trop**, v. 96, n. 1, p. 9-15, 2005.

CROFT, S.L. AND COOMBS, G. H. (2003) , Leishmaniasis – current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitology**, 19, 502-508.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug Resistance in Leishmaniasis. **Clin. Microbiol. Rev**, v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.

CROFT, S.L.; COOMBS, G.H. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends Parasitol**, v. (11), p. 502-508, 2003.

CUSHNIE, T. P.; LAMB, A. J. Antimicrobial activity of flavonoids. **Int. J. Antimicrob. Agents**, v. 26, p. 343-356, 2005.

VALADARES, D.G.; DUARTE, M.C.; OLIVEIRA, J.S; CHAVEZ-FUMAGALLI, M.A.; MARTINS, V.T.; COSTA, L.E. Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species, **Parasitol. Int.** 60357e363, 2011.

DAVID, C.V.; CRAFT, N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Dermatol. Ther**, v. 22(6), p. 491-502, 2009.

DAY, A. J.; WILLIAMSON, G. Absorption of quercetin glycosides. In: RICE-EVANS, C.; PACKER, L. **Flavonoids in health and disease**. New York: Marcel Dekker, 2003. p.31-412.

DA SILVA, P.R.R. Atividade leishmanicida do extrato da raiz de *Physalis angulata* e sua ação na célula hospedeira, 2013. 106f. Tese (Mestrado em Biologia) – Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, Pará.

DE ALMEIDA M.C.; CARDOSO S.A.; BARRAL-NETTO M., 2003. *Leishmania (Leishmania) chagasi* infection alters the expression of cell adhesion and costimulatory

molecules on human monocyte and macrophage. **Int. J. Parasitol.** 33: 153-162.

DE SOUZA, W. An introduction to the structural organization of parasitic protozoa. **Curr. Pharm.**, v. 14, n. 9, p. 822-838, 2008.

DESCHNER E.E, J. RUPERTO, G. WONG, H.L. Newmark Quercetin and rutin as inhibitors of azoxymethanol-induced colonic neoplasia. **Carcinogenesis**, 12 (1991), pp. 1193–1196.

DESJEUX, P. Human leishmaniasis: epidemiology and public health aspects. **World Health Stat Q.** 1992; 45: 267-275.

DONOVAN, J. L.; WATERHOUSE, A. L. Bioavailability of flavanol monomers. In: RICE-EVANS, C.; PACKER, L. **Flavonoids in health and disease**. New York: Marcel Dekker, 2003. p.413-440.

DRAGO, I. S.; HUBER, L. S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. The Amazonian fruits taperebá (*Spondias mombin*) and murici (*Byrsonima crassifolia*) have higher levels of quercetin than commercial fruits. In: INTERNATIONAL FOOD DATA CONFERENCE, 7th, São Paulo, 2008. **Conferência...** São Paulo, 2008.

DUJARDIN J-C 2006. Risk factors in the spread of leishmaniasis : Towards integrated monitoring? **Trends Parasitol** 22: 4-6.

DUTRA, L.A.; DE ALMEIDA, L.; PASSALACQUA T.G. REIS, J.S.; TORRES F.A; MARTINEZ, I.; PECCININI, R.G.; CHIN, C.M.; CHEGAEV, K. GUGLIELMO, S.; FRUTTERO, R.; GRAMINHA, M.A.; DOS SANTOS, J.L. Leishmanicidal activities of novel synthetic furoxan and benzofuroxan derivatives. **Antimicrob Agents Chemother.**, Aug;58(8):4837-47, 2014.

ELLIS M, BERNSEN R.; BERNSEN, R.; ALI-ZADEH, H. KRISTENSEN, J.; HEDSTRÖM, U.; PUGHAS, L.; BRESNIK, M.; AL-ESSA, A.; STEVENS, D.A. A safety and feasibility study comparing an intermittent high dose with daily standard

dose of liposomal amphotericin B for persistent neutropenic fever. **J. Med. Microbiol.** 2009 Nov; 58(Pt11):1474-85,2009.

EL-SAYED, M.; ANWAR, A.E. Intralesional sodium stibogluconate alone or its combination with either intramuscular sodium stibogluconate or oral ketoconazole in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis: a comparative study. **J. Eur. Acad. Dermatol. Venereol.** v. 24, n. 3, p. 335-340, 2010.

ERLUND, I. Review of the flavonoids quercetin, hesperetin, and naringenin. Dietary sources, bioactivities, bioavailability, and epidemiology. **Nutr. Res.**, v.24, p.851-874,2004.

ESPOSITO , M.; VENKATESH, V.; OTVOS, L. WENG, Z.; VAJDA, S.; BANKI, K.; PERL, A. Human transaldolase and cross-reactive viral epitopes identified by autoantibodies of multiple sclerosis patientis. **J. Immunol.** 163,4027-4032,1999.

FICH, K.;THEANDER T.G.; KHARAZMI A. Licochalcone A, a novel antiparasitic agent with potent activity against human pathogenic protozoan species of *Leishmania*. **Antimicrob. Agents Ch.** 37: 2550-2556,1993.

FOURNET, A.; BARRIOS A.A.; MUNÓZ, V.; HOCQUEMILLER, C.A. Effects of natural naphtoquinones in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis* and *L. venezuelensis*. **Ann Trop Med Parasit** 43: 219-222,1992.

FOURNET, A.; FERREIRA, M.E.; DE ARIAS, A.R.; DE ORTIZ, S.T.;FUENTES, S.; NAKAYAMA, H.; SCHININI, A.; HOCQUEMILLER R. *In vitro* efficacy of oral and intralesional administration of 2-substituted quinolines in experimental treatment of new world cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania amazonensis*. **Antimicrob Agents Ch.** 40: 2447-2451,1996.

FRANÇA, F.; CUBA, C.A.; MOREIRA, E.A.; MIGUEL, O.; ALMEIDA, M.; DAS VIRGENS, M.L.; MARSDEN P.D. Avaliação do efeito do extrato de casca de cajueiro-branco (*Anacardium occidentales*) sobre a infecção por *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, 26:151-155,1993.

FRANÇA, F.; LAGO, E.L.; MARSDEN, P.D. Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic area of Bahia, Brazil. **Rev. Soc. Bras.Med. Trop.** 29: 229-232,1996.

FRÉZARD, F.; DEMICHELI, C. New delivery strategies for the old pentavalent antimonial drugs. **Expert Opin Drug Deliv**, v. 7 (12), p.1343-1358, 2010.

GALATI, E.M.; MONDELLO, M.R.; GIUFFRIDA, D.; DUGO, G.; MICELI, N.; PERGOLIZZI, S.; TAVIANO, M.F. Chemical characterization and biological effects of Sicilian *Opuntia ficus-indica* [L.] Mill. Fruit juice: antioxidant and antiulcerogenic activity. **J. Agric. Food Chem.** 51:4903-4908,2003.

GARNIER, T.; BROWN, M.B.; LAWRENCE, M.J.; CROFT, S.L.; *In-vitro* and *in-vivo* studies on a topical formulation of sitamaquine dihydrochloride for cutaneous leishmaniasis. **J. Pharm Pharmacol**, v. 58(8), p. 1043-1054,2006.

GLUENZ, E.; GINGER, M.L.; MCKEAN, P.G. Flagellum assembly and function during the *Leishmania* life cycle. **Curr Opin Microbiol**, v. 13(4), p. 473-479, 2010.

GOTO, H.; LINDOSO, J.A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Rev Anti Infect Ther**, v. 8 (4), p. 419-33, 2010.

HALLIWELL, B.; ZHAO, K.; WHITEMAN, M. The gastrointestinal tract: a major site of antioxidant activity? **Free Rad. Res.**, v.33, p.819-830, 2000.

HEIJNEN, C.G.; HAENEN, G.R.; OOSTVEEN R.M.; STALPERS, E.M.; BAST, A. Protection of flavonoids against lipid peroxidation: the structure activity relationship revisited. **Free Rad. Res.**, v. 36, 575-581, 2002.

HERMANN, K. On the occurrence of flavonol and flavone glycosides in vegetables. **Z. Lebensm. Unters. F. A**, v.186, p.1-5, 1988.

HOFFMANN-RIBANI, R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Occurrence of flavonoids in

Brazilian fruits. In: INTERNATIONAL FOOD DATA CONFERENCE, 6th, Pretoria, África do Sul, 2005. **Conferência...** Pretoria, 2005.

HUBER, L.S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Flavonóis e flavonas: fontes brasileiras e fatores que influenciam a composição em alimentos. **Alim. Nutr.**, Araraquara v.19, n.1, p. 97-108, 2008.

HUBER, L. S.; HOFFMANN-RIBANI, R.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Quantitative variation in Brazilian vegetable sources of flavonols and flavones. **Food Chem.**, doi: 10.1016, 2008.

IWU, M.M.; JACKSON, J.E.; SCHUSTER, B.G. Medicinal plants in the fight against leishmaniasis. **Parasitol Today** 10: 65-68, 1994.

RODRIGUES, K.A.; AMORIM, L.V.; DIAS, C.N.; MORAES, D.F.; CARNEIRO, S.M.; CARVALHO, F.A. *Syzygium cumini* (L.) yields essential oil and its major constituent α -pinene exhibit anti-*Leishmania* activity through immunomodulation in vitro. **J. Ethnopharmacol.** 160 32e40,2015.

KAM, T.S.; SIM, K.M.; KOYANA, T.; TOYOSHIMA, M.; HAYASHI, M. KOMIYAMA, K. Cytotoxic and leishmanicidal aminoglycosteroids and aminosteroids from *Holarrhena curtisii*. **J. Nat. Prod** 61: 1332-1336,1997.

KAM, T.S.; SIM, K.M.; KOYANO, T.; TOYOSHIMA, M.; Leishmanicidal alkaloids from *Kopsia griffithii*. **Phytochemistry** 50:75-79,1999.

KANDASWAMI, C.; MIDDLETON, E. Free radical scavenging and antioxidant activity of plant flavonoids. **Adv. Exp. Med. Biol.**, 366, pp. 351–376,1994.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604-15, 2011.

KAYSER, O.; KIDERLEN, A.F.; LAATSCH, H.; CROFT, S.L. *In vitro* leishmanicidal activity of monomeric and dimeric naphthoquinones. **ActaTropica** 77: 307-314,2000.

KIM, D.H. ; HYE JIN CHUNG, H.J.; BLEYS, J.; REZA F. Ghohostani Is paromomycin an effective and safe treatment against cutaneous leishmaniasis? A meta-analysis of 14 randomized controlled trials. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3 n. 2, e381, 2009.

KRAUSE, G.; KROEGER, A. Topical treatment of American cutaneous leishmaniasis with paramomycin and methylbenzethonium chloride: a clinical study under field conditions in Ecuador. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 88, n. 1, p. 92-94, 1994.

KUNTZ, S.; WENZEL, U.; DANIEL, H. Comparative analysis of the effects of flavonoids on proliferation, cytotoxicity, and apoptosis in human colon cancer cell lines. **Eur. J. Nutr.**, v.38, p.133-142, 1999.

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

LEE, E.S.; LEE, H.E.; SHIN, J.Y.; YOON, S. MOON, J.O. The flavonoid quercetin inhibits dimethylnitrosamine-induced liver damage in rats. **J. Pharm. Pharmacol.**, v. 55, p. 1169-1174, 2003.

MAHIOU, V. ROBLLOT, F.; HOCQUEMILLER, R. CAVÉ, A.; DE ARIAS, R.; INCHAUSTI, A.; YALUFF, G.; FOURNET, A.; ANGELO, A. New aporphine alkaloids from *Guatteria foliosa*. **J. Nat. Prod** 57: 890- 895, 1994.

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

MARSDEN, P.D AND JONES, T.C. Clinical manifestations, diagnosis and treatment of leishmaniasis. Coordinating ed, E. Chang and R.S. Bary.; **Elsevier Science Publisher, Amsterdam**. 1985.

MATHIAS, L.A.; EMILY, A. Tapping and Amazonian plethora: four medicinal plants of Marajó Island, Pará - Brazil. **J. Ethnopharmacol** 40:53-75,1993.

MATSUBARA, S.; RODRIGUEZ-AMAYA, D. B. Conteúdo de miricetina, quercetina e kaempferol em chás comercializados no Brasil. **Ciênc. Tecnol. Alim.**, v. 26, n.2, p. 380-385, 2006.

MAURER, M.; DONDI, B.; VON STEBUT, E. What determines the success or failure of intracellular cutaneous parasites? Lessons learned from leishmaniasis. **Med. Microbiol Immunol**, v. 198 (3), p.137-146, 2009.

MIKSICEK, R. J. Estrogenic flavonoids: structural requirements for biological activity. **Proc. Soc. Exp. Biol.Med.**, v.208, p.44-50, 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. 2ª Edição atualizada; 2007.

MISHRA, B. B.; KALE, R. R.; SINGH, R. K. & TIWARI, V. K. Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. **Fitoterapia**, v. 80, p. 81–90. 2009.

MITROPOULOS, P.; KONIDAS; DURKIN-KONIDAS, M. New world cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. **J. Am Acad Dermatol**, v. 63, p. 309-322, 2010.

MITTAL, N.; GUPTA, N.; SAKSENA, S.; GOYAL, N.; ROY, U. Protective effect of picrolive from *Pichrorhiza kurroa* against *Leishmania donovani* infections in *Mesocricetus auratus*. **Life Sci** 63: 1823-1834,1998.

MITTRA B.; SAHA, A.; CHOWDHURY,A.R. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. **Mol Med**. Jun; 6(6): 527–541,2000.

MOON, Y. J.; WANG, X.; MORRIS, M. E. Dietary flavonoids: effects on xenobiotic and carcinogen metabolism. **Toxicol. Vitro**, v. 20, p. 187-210, 2006.

MOREIRA, R.C.R.; REBÊLO, J.M.M.; GAMA, M.E.A.,; COSTA, J.M.L. Nível de conhecimento sobre Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) e uso de terapias alternativas por populações de uma área endêmica da Amazônia do Maranhão, Brasil. **Caderno de Saúde Pública** 18: 187-195, 2002.

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

NAKAMURA, S.; MURAKAMI, T. Structures of new cucurbitane-type triterpenes and glycosides, karavilagenins and karavilosides, from the dried fruit of *Momordica charantia* L. in Sri Lanka. **Chem. Pharm. Bull. (Tokyo)** 54, 1545–1550, 2006.

NEUBER, H. Leishmaniasis. **J. Dtsch Dermatol Ges**, v. 6, p. 754-765. 2008.

NIJVELDT, R.J.; NOOD, E.; HOORN, D.E.; BOELEN, P.G.; NORREN, K.; LEEUWEN, P.A. Flavonoids: a review of probable mechanisms of action and potential applications. **Am. J. Clin Nutr** ;74:418–25, 2001.

NYLÉN, S.; EIDSMO, L. Tissue damage and immunity in cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol**, v. 34(12), p. 551-561, 2012.

OKWOR, I.; UZONNA, J. Vaccines and vaccination strategies against human cutaneous leishmaniasis. **Hum Vaccin**, v. 5 (5), p. 291-301, 2009.

ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (OMS). Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> Acesso em : 19/05/2016.

ORSOLIC, N.; KNEZEVIĆ, A.H.; SVER, L.; TERZIĆ, S.; BASIĆ, I.

Immunomodulatory and antimetastatic action of propolis and related polyphenolic compounds. **J. Ethnopharmacol.**, v. 94, p. 307-315, 2004.

PACIFICI, G. M. Inhibition of human liver and duodenum sulfotransferases by drugs and dietary chemicals: a review of the literature. **Int. J. Clin. Pharmacol. Ther.**, v. 42, p. 488-495, 2004.

PALUMBO, E. Treatment strategies for mucocutaneous leishmaniasis. **J. Glob. Infect Dis**, v. 2 (2), p. 147-50, 2010.

PATEL, P.C.; HARRISON, R.E. Membrane ruffles capture C3bi-opsonized particles in activated macrophages. **Mol. Biol. Cell**, v. 19(11), p. 4628-4639, 2008.

PATEL, S.; SETHI, A. Imported tropical diseases. **Dermatol. Ther**, V. 22(6), p. 538-49, 2009.

PEREZ-VIZCAINO, F.; BISHOP-BAILLEY, D.; LODI, F.; DUARTE, J.; COGOLLUDO, A.; MORENO, L.; BOSCA, L.; MITCHELL, J.A.; WARNER, T.D. The flavonoid quercetin induces apoptosis and inhibits JNK activation in intimal vascular smooth muscle cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 346, p. 919-925, 2006.

POLONIO, T.; EFFERTH, T. Leishmaniasis: drug resistance and natural products (review). **Int. J. Mol Med**, v. 22 (3), p. 277-86, 2008.

PRIOR, R. L.; CAO, G. Antioxidant phytochemicals in fruits and vegetables. Diet and health implication. **Hortic. Sci.**, v.35, p.588-592, 2000.

QUEIROZ, E.F.; ROBLOT, F.; CAVE, A. Pessoine and spinosine, two catecholic berberines from *Annona spinescens*. **J.Nat Prod** 59: 438-440,1996.

RAMÍREZ-MACÍAS I.; MARÍN, C.; DÍAZ, J.G.; ROSALES, M.J.;GUTIÉRREZ-SÁNCHEZ, R.;MANUEL SÁNCHEZ-MORENO, M.; Leishmanicidal activity of nine novel flavonoids from *Delphinium staphisagria*.**The Scientific World Journal** doi:

10.1100/203646,2012.

RATH, S.; TRIVELIN, L.A.; IMBRUNITO, T.R.; TOMAZELA, D.M.; DE JESÚS, M.N.; MARZAL, P.C.; DE ANDRADE, H.F.; TEMPONE, A.G.; Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Quim Nova** 26: 550-553, 2003.

READ, M. A. Flavonoids: naturally occurring antiinflammatory agents. **Am. J. Pathol.**, v.147, p.235-237, 1995.

ROCHA, L.G.; ALMEIDA, J.R.G.S.; MACÊDO, R.O.; BARBOSA, F.J.M. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine** 12: 514-535, 2005.

RODRIGUES, K.A.; DIAS, C.N.; NÉRIS, P.L.; ROCHA, J.C.; SCOTTI, M.T.; SCOTTI, L. MASCARENHAS, S.R.; VERAS, R.C.; DE MEDEIROS, I.A.; KEESEN T.S.; DE OLIVEIRA, T.B.; DE LIMA, M.D.O. C.; BALLIANO, T.L.; DE AQUINO, T.M.; DE MOURA, R.O.; MENDONÇA, JUNIOR F.J.; DE OLIVEIRA, M.R. 2-Amino-thiophene derivatives present antileishmanial activity mediated by apoptosis and immunomodulation *in vitro*. **Eur J Med Chem.** Dec 1;106:1-14, 2015.

ROYO, V.A.; SANTOS, F.F.; SOUZA, V.A.; PEREIRA, A.C.; DA SILVA, R.; VINHÓLIS, A.H.C.; DONATE, P.M.; SILVA, M.L.A.; ALBUQUERQUE, S.; BASTOS, J.K. Biological activity evaluation of dibenzilbutirolactones lignans derivatives against *Leishmania braziliensis*. **Rev Bras Farmacogn** 13(Supl.): 18-21, 2003.

SAUVAIN M, KUNESCH N, POISSON J, GANTIER J-C, GAYRAL P, DEDET J-P 1996. Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from Amazonian liana *Doliocarpus dentatus* (Dellineaceae) **Phytother Res** 10:1-4.

SCHMIDT, T.J.; KHALID, S.A.; ROMANHA, A.J. ALVES, T.M.; BIAVATTI, M.W.; BRUN, R.; DA COSTA F.B.; DE CASTRO, S.L. FERREIRA, V.F.; DE LACERDA, M.V.; LAGO J.H.; LEON L.L.; LOPES, N.P.; DAS NEVES A.R.C.; NIEHUES, M. OGUNGBE, I.V.; POHLIT, A.M.; SCOTTI, M.T.; SETZER, W.N.; SOEIRO,

M.;STEINDEL, M.; TEMPONE, A.G. The potential of secondary metabolites from plants as drugs or leads against protozoan neglected diseases-part I. **Curr. Med. Chem.** 19, 2128–2175,2012.

SCHRIEFER, A.; GÓES-NETO, A.; GUIMARÃES, L.H.;MACHADO,P.R.L; LESSA,M.; LESSA,H.A; LAGO,E.; RITT,G.; SCHRIEFER,A.L.F; LEE W.; RILEY,L.W.; CARVALHO,E.M. Geographic Clustering of leishmaniasis in Northeastern Brazil. **Emerging Infectious Diseases**. Jun; 15 (6): 871-6,2009.

SCHROETER, H. BOYD, C.; SPENCER, J.P.; WILLIAMS, R.J; CADENAS, E. RICE-EVANS, C. MAPK signaling in neurodegeneration: influences of flavonoids and of nitric oxide. **Neurobiol. Aging**, v.23, p.861-880, 2002.

SCHWARZ, D.; KISSELEV, P.; ROOTS, I. CYP1A1 genotype-selective inhibition of benzo (α) pyrene activation by quercetin. **Eur. J. Cancer**, v. 41, p. 151-158, 2005.

DA SILVA S.A.G.; DA COSTA, S.S.; MENDONÇA, S.C.F.; SILVA, E.M.; MORAES, V.L.; ROSSI-BERGMANN, B. Therapeutic effect of oral *Kalanchoe pinnata* af extract in murine leishmaniasis. **Acta Tropica** 60: 201-210,1995.

SILVA, N.S.; MUNIZ, V.D. Epidemiology of American tegumentary leishmaniasis in the State of Acre, Brazilian Amazon. **Cad Saúde Pública**, v. 25 (6), p.1325-1336, 2009.

SILVEIRA, F.T.; LAINSON, R.; CORBETT, CE. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 99 (3), p. 239-251, 2004.

SIMPSON, L.; KRETZER. F. The mitochondrion in dividing *Leishmania tarentolae* cells is symmetric and circular and becomes a single asymmetric tubule in non-dividing cells due to division of the Kinetoplast portion. **Mol Biochem Parasitol**, v. 87(1), p. 71-78, 1997.

SKLAVOS, A.V.; WALLS, T.; WEBBER, M.T.;WATSON, A.B. Cutaneous leishmaniasis in a child treated with oral fluconazole. **Australas J Dermatol**, v. 51 (3),

p. 195-197, 2010.

SOTO, J.; TOLEDO, J.; GUTIERREZ, P.; NICHOLLS, R.S.; PADILLA J. ENGEL, J.; FISCHER, C.; VOSS, A. BERMAN, J. Treatment of American cutaneous leishmaniasis with miltefosine, an oral agent. **Clin. Infect. Dis**, v. 33, E57—E61, 2001.

SOTO, J.; BERMAN, J. Treatment of New World cutaneous leishmaniasis with miltefosine. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 100 Suppl 1, S34-40, 2006.

SPENCER, J.P.E.; SCHROETER, H.; RECHNER, A.R.; RICE-EVANS, C. Bioavailability of flavan-3-ols and procyanidins: gastrointestinal tract influences and their relevance to bioactive forms *in vivo*. **Antiox. Redox Sign.**, v.3, 1023-1039, 2001.

SPENCER, J.P. Metabolism in the small intestine and gastrointestinal tract. **Flavonoids in health and disease**. New York: Marcel Dekker, 2003. p.363-390.

STAPLETON, A. E.; WALBOT, V. Flavonoids can protect maize DNA from the induction of UV radiation damage. **Plant Physiol.**, v.105, p.881-889, 1994.

SUNDAR, S.; JHA, T.K.; M.D., CHANDRESHWAR P. THAKUR, M.D.; SINHA, K.P.; M.D., SUJIT, K.; BHATTACHARYA, M.D. Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India. **N Engl J Med** v. 21, 356(25), p. 2571-2581, 2007.

TASDEMIR, D.; KAISER, M.; BRUN, R.; YARDLEY, V.; SCHMIDT, T.J.; TOSUN, F. RÜEDI, P. Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: *In vitro*, *In vivo*, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies. **Antimicrob Agents Chemother**. 50(4):1352–64, 2006.

TEIXEIRA, D.E. Atlas didático: Ciclo de vida da *Leishmania*. 1º Ed. Rio de Janeiro. **Fundação CECIERJ**, Consórcio CEDERJ, 2013.

TORRES-SANTOS, E.C. MOREIRA D.L. KAPLAN, M.A.C. Selective effect of 2,6-dihydroxy-4-methoxychalcone isolated from *Piper aduncum* *Leishmania amazonensis*. **Antimicrob Agents Ch** 43: 1234-1241, 1999.

WALLE, T.; WALGREN, R.A.; WALLE, U.K.; GALIJATOVIC, A.; VIDYANATHAN, J.B. Understanding the bioavailability of flavonoids through studies in Caco-2 cells. **Flavonoids in health and disease**. New York: Marcel Dekker, 2003. p.349-362.

WENZEL, U.; KUNTZ, S.; BRENDDEL, M.D. DANIEL H. Dietary flavone is a potent apoptosis inducer in human colon carcinoma cells. **Cancer Res.**, v.60, p.3823-3831, 2000.

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

WHO EXPERT COMMITTEE. Control of the leishmaniasis. WHO technical report series; no. 949. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva, 22–26 March 2010. Disponivel em: <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=3307017&tool=pmcentrez&rendertype=abstract>.

WILLIAMS, R. J.; SPENCER, J. P. E.; RICE-EVANS, C. Flavonoids: antioxidants or signaling molecules? In: RICE-EVANS, C. Serial review: flavonoids and isoflavones (Phytoestrogens): absorption, metabolism, and bioactivity. **Free Rad. Biol. Med.**, v.36, n.7, p.838-849, 2004.

WILSON, R.; BATES, M.D.; DOSTALOVA, A.; JECNA, L.; DILLON, R.J; VOLF, P.; BATES, P.A. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to sandfly midguts assessed using an improved comparative binding assay. **PLoS Negl Trop Dis**, v.7;4(9), pii: e816, 2010.

WINKEL-SHIRLEY, B. Flavonoid biosynthesis. A colorful model for genetics, biochemistry, cell biology, and biotechnology. **Plant Physiol.**, v.126, p.485-493, 2001.

WOLFRAM, S. Effects of green tea and EGCG on cardiovascular and metabolic health. **J. Am. Coll. Nutr.**, 2007, 26, 373S-88S.

WORTMANN, G.; ZAPOR, M.; FRASER, S; HARTZELL, J.; PIERSON, J.; WEINTROB, A.; MAGILL, A. Liposomal amphotericin B for treatment of cutaneous leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 83(5), p.1028-1033, 2010.

9 ANEXOS

ANEXO A - Parecer de aprovação do presente projeto pelo comitê de ética do Hospital Universitário Lauro Wanderley.

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO
LAURO WANDERLEY/UFPB



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Leishmaniose Visceral Humana: Estudo de marcadores imunológicos e sua importância no prognóstico de doença sintomática e assintomática

Pesquisador: Tatjana Keesen de Souza Lima

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 17813013.8.0000.5183

Instituição Proponente: Hospital Universitário Lauro Wanderley/UFPB

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 404.854

Data da Relatoria: 24/09/2013

Apresentação do Projeto:

A leishmaniose visceral é uma doença endêmica na região do nordeste incluindo o estado da Paraíba e possui um forte impacto na população. O modelo epidemiológico deixou de ser totalmente rural e esta doença se tornou prevalente também em zonas urbanas e peri-urbanas. O projeto de pesquisa tem como proposta estudar a leishmaniose que é uma doença infecciosa causada por várias espécies de protozoários do gênero Leishmania.

Serão selecionados 3 grupos de indivíduos: 1) com leishmaniose visceral com sintomatologia e 2) indivíduos assintomáticos, com sorologia positiva e sem sintomatologia clínica, além de 3) indivíduos com sorologia negativa e com nenhuma sintomatologia. Os pacientes com leishmaniose visceral serão provenientes de áreas endêmicas da Paraíba. O diagnóstico da doença será baseado em achados clínicos e testes laboratoriais, padrão utilizados nos centros de referência, incluindo demonstração parasitológica e presença de anticorpos anti-leishmania. Os indivíduos não infectados e assintomáticos serão selecionados de acordo com uma anamnese detalhada e exames sorológicos. Todos os indivíduos que contribuirão para a realização deste trabalho participarão voluntariamente da pesquisa, sendo esclarecidos sobre a importância do trabalho e assinarão o termo de consentimento esclarecido (TCLE). Após

Endereço: HULW-4º andar - Campus I - UFPB

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 58.059-900

UF: PB

Município:

Telefone: (833)216-7302

Fax: (833)216-7522

E-mail: iaponiracortez@yahoo.com.br; cephulw@hotmail.