

Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

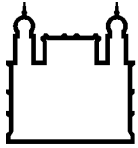
Estudo do efeito e mecanismo de ação da Epigallocatequina-3-galato em *Leishmania braziliensis*

JOB DOMINGOS INÁCIO FILHO

**Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular**

RIO DE JANEIRO

2013



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular

Job Domingos Inácio Filho

ESTUDO DO EFEITO E MECANISMO DE AÇÃO DA EPIGALOCATEQUINA-3- GALATO EM *LEISHMANIA BRAZILINSIS*

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

Orientador: Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral

RIO DE JANEIRO

2013

Inácio Filho, Job Domingos.

Estudo do efeito e mecanismo de ação da Epigalocatequina-3-galato em *Leishmania braziliensis* / Job Domingos Inácio Filho. - Rio de Janeiro, 2013.
85 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular, 2013.

Orientador: Elmo Eduardo de Almeida Amaral.

Bibliografia: Inclui Bibliografias.

1. Quimioterapia. 2. *Leishmania braziliensis*. 3. Leishmaniose. 4. Epigalocatequina-3-galato. 5. Espécies reativas de oxigênio. I. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da Biblioteca de Manguinhos/ICICT com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

JOB DOMINGOS INÁCIO FILHO

**Estudo do efeito e mecanismo de ação da Epigalocatequina-3-galato em
*Leishmania braziliensis***

**Orientador:
Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral**

EXAMINADORES:

Dr^a. Leonor Laura Pinto Leon
IOC – FIOCRUZ

Dr. Eduardo Fonseca Pinto
IOC – FIOCRUZ

Dr. José Roberto Meyer Fernandes
UFRJ

SUPLENTE:

Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos (Revisor – FIOCRUZ)

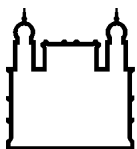
Dr^a. Marilene Marcuzzo do Canto Cavalheiro (IOC – FIOCRUZ)

Rio de Janeiro
2013

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Bioquímica de Tripanosomatídeos do Instituto Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, sob a orientação do Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral.

DEDICATÓRIA

Aos meus familiares,
orientador e amigos do
laboratório.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

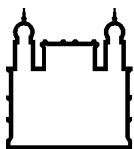
ESTUDO DO EFEITO E MECANISMO DE AÇÃO DA EPIGALOCATEQUINA-3-GALATO EM *LEISHMANIA BRAZILIENSIS*

RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Job Domingos Inácio Filho

A leishmaniose é uma doença causada por espécies de protozoários parasitos do gênero *Leishmania*. É endêmica em mais de 98 países e 350 milhões de pessoas vivem em local de risco da infecção, sendo o parasito da espécie *Leishmania braziliensis* o maior responsável pela doença no Brasil. Compostos naturais apresentam significativa atividade antiprotozoários, sem elevada toxicidade. A epigalocatequina-3-galato (EGCG), principal catequina do chá verde, é um flavonóide que apresenta propriedades farmacológicas, como atividades antiinflamatórias, microbicida e atividades tripanosomicidas. No presente estudo, demonstramos o mecanismo de ação da EGCG em promastigotas e amastigotas de *L. braziliensis*, e a sua atividade *in vivo*. A EGCG inibiu a proliferação de promastigotas do parasito de maneira dose dependente apresentando uma inibição de 69,6% em 72 horas com a concentração de 500 μ M, com IC₅₀ de 278,5 μ M. Alterações nos níveis de produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) foram observadas em promastigotas de *L. braziliensis* tratadas com concentrações crescentes de EGCG. Esta produção foi prevenida pela pré-incubação com catalase e PEG-catalase. EGCG também causou disfunção mitocondrial, gerando uma perda no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\psi_m$), quantificado por Rodamina 123 e JC-1, além de causar uma diminuição da atividade da tripanotiona redutase, enzima responsável no balaço redox do parasito. Observamos também que, em amastigotas, EGCG causou uma inibição de 73% e 77,7% no índice de infecção na concentração de 12 μ M em 24 e 72 horas respectivamente, apresentando um IC₅₀ de 4,4 μ M e 3,5 μ M no tempo de 24 e 72 horas respectivamente. Assim como em promastigotas, EGCG foi capaz de gerar produção de ERO em amastigotas, que foi prevenida com catalase e PEG-catalase. No estudo do efeito em camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* observamos uma diferença significativa do tamanho da lesão do grupo tratado com EGCG comparado ao grupo controle, o qual recebeu PBS (veículo do composto utilizado). Ensaio de toxicidade revelaram que o composto não causou danos renais ou hepáticos, demonstrando a sua eficácia e segurança.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

STUDY OF THE EFFECT AND MECHANISM OF ACTION OF EPIGALLOCATECHIN-3-GALLATE IN *LEISHMANIA BRAZILIENSIS*

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN BIOLOGIA CELULAR E MOLECULAR

Job Domingos Inácio Filho

Leishmaniasis is a disease caused by protozoan species of the genus *Leishmania*. It is endemic in more than 98 countries and 350 million people live in a risk of infection, the parasite of species *Leishmania braziliensis* is the most responsible for disease in Brazil. Currently, natural compounds have significant antiprotozoal activity without high toxicity. The epigallocatechin-3-gallate (EGCG), the major catechin in green tea, is a flavonoid that has pharmacological properties such as anti-inflammatory, microbicidal and trypanocidal activities. In the present study, we demonstrated the mechanism of action of EGCG in promastigotes and amastigotes of *L. braziliensis*, and its activity *in vivo*. EGCG inhibits the proliferation of the parasite promastigote in a dose dependent manner showing an inhibition of 69,6% in 72 hours with a concentration of 500 μ M, with IC₅₀ of 278,5 μ M. Changes in the levels of production of reactive oxygen species (ROS) were observed in promastigotes of *L. braziliensis* treated with increasing concentrations of EGCG. This production was reversed by pre-incubation with catalase and PEG-catalase. EGCG also caused mitochondrial dysfunction, causing a loss in mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$), measured using rhodamine 123 and JC-1, in addition EGCG caused a decrease in activity of trypanothione reductase, the enzyme responsible for the balance redox in parasite. We also note that, in amastigotes EGCG caused an inhibition of 73,04% and 77,71% at the index of infection at a concentration of 12 μ M in 24 and 72 hours respectively, showing an IC₅₀ of 4,45 μ M and 3,5 μ M at 24 and 72 hours respectively. As in promastigote, EGCG caused ROS production in amastigotes, which were reversed with catalase and PEG-catalase. In the study of the effect in BALB/c mice infected with *L. braziliensis* was observed a significant difference in lesion size in the group treated with EGCG compared to the control group, which received PBS (vehicle compound used). Toxicity tests have shown that the compound did not cause kidney or liver damage, demonstrating its efficacy and safety.

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Doenças tropicais negligenciadas	1
1.2	Leishmanioses	1
1.2.1	Vetores da leishmaniose.....	3
1.2.2	Parasito Leishmania	3
1.2.3	Ciclo biológico.....	5
1.2.4	Manifestações clínicas das leishmanioses	7
1.3	Quimioterapia	10
1.3.1	Antimoniais pentavalentes	11
1.3.2	Anfotericina B	12
1.3.3	Pentamidina.....	13
1.3.4	Miltefosina.....	14
1.3.5	Paramomicina.....	14
1.3.6	Tratamentos alternativos	15
1.4	Desenvolvimento de fármacos	15
1.5	Produtos naturais com atividade leishmanicida	15
1.5.1	Flavonóides	16
1.5.2	Epigalocatequina-3-galato	17
1.6	Mitocôndria e produção de espécies reativas de oxigênio	18
1.7	Sistema antioxidante em tripanosomatídeos	20
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo Geral	23
2.2	Objetivos Específicos	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	Fármacos	24
3.2	Parasitas	24
3.3	Animais	24
3.4	Ensaio <i>in vitro</i>	24
3.4.1	Atividade antipromastigota.....	25
3.4.2	Atividade anti-amastigota.....	25

3.5	Viabilidade dos macrófagos com EGCG	26
3.6	Dosagem da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂).....	26
3.6.1	Produção de ERO.....	26
3.6.2	Produção de H ₂ O ₂	27
3.7	Atividade de catalase e PEG-catalase sobre o efeito da EGCG	28
3.8	Atividade da Tripanotiona redutase (TR)	28
3.9	Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	29
3.9.1	Ensaio por citometria de fluxo utilizando Rodamina 123	29
3.9.2	Ensaio por espectrofluorimetria usando JC-1	30
3.10	Determinação dos níveis de ATP intracelular.....	30
3.11	Ensaio <i>in vivo</i>	30
3.11.1	Avaliação de parâmetros toxicológicos.....	31
3.12	Análise estatística	32
4	RESULTADOS	33
4.1	Ensaio <i>in vitro</i>.....	33
4.1.1	Atividade antipromastigota.....	33
4.2	Dosagem da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂).....	34
4.2.1	Produção de ERO.....	34
4.2.2	Produção de H ₂ O ₂	35
4.2.3	Efeito da catalase e PEG-catalase em promastigotas tratados com EGCG.....	36
4.3	Atividade da Tripanotiona redutase (TR)	37
4.4	Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	38
4.4.1	Ensaio utilizando rodamina 123.....	38
4.4.2	Ensaio utilizando o JC-1	40
4.5	Determinação dos níveis de ATP intracelular.....	41
4.6	Atividade anti-amastigota	42
4.6.1	Produção de ERO em amastigotas intracelulares tratados com EGCG	44

4.6.2	Efeito da catalase e PEG-catalase em macrófagos infectados e tratados com EGCG	45
4.7	Atividade <i>in vivo</i>.....	48
5	DISCUSSÃO	51
6	CONCLUSÕES	59
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	61

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição da leishmaniose visceral ao redor do mundo.....	2
Figura 2 - Distribuição da leishmaniose tegumentar ao redor do mundo.....	2
Figura 3 – Vetores da leishmaniose.....	3
Figura 4 – Morfologia das formas evolutivas de <i>Leishmania</i>	4
Figura 5 - Taxonomia da família Trypanosomatidae.....	5
Figura 6 - Ciclo biológico da <i>Leishmania</i>	6
Figura 7 – Formas clínicas da leishmaniose.....	10
Figura 8 - Estrutura básica do flavonóide.....	17
Figura 9 - Estrutura química da epigallocatequina-3-galato.....	18
Figura 10 – Ultraestrutura celular de promastigota de <i>Leishmania amazonensis</i>	18
Figura 11 – ERO e a sua contribuição para diversas doenças.....	20
Figura 12 – Reações dependentes da tripanotona.....	21
Figura 13 – Redução da tripanotona oxidada pela tripanotona redutas.....	22
Figura 14 - Atividade antipromastigota da EGCG.....	33
Figura 15 – Formação de ERO intracelular em promastigotas tratadas com EGCG.....	35
Figura 16 – Produção intracelular de H ₂ O ₂	36
Figura 17 – Efeito da catalase e PEG-catalase sobre o tratamento com a EGCG.....	37
Figura 18 – Efeito da EGCG sobre a atividade da enzima tripanotona redutase.....	38
Figura 19 – Determinação do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo.....	40
Figura 20 – Determinação do potencial de membrana mitocondrial por espectrofluorimetria.....	41
Figura 21 – Determinação dos níveis de ATP intracelular.....	42
Figura 22 – Atividade antimastigota da EGCG.....	43
Figura 23 – Efeitos citotóxicos da EGCG em macrófagos murinos.....	44
Figura 24 – Produção de ERO em amastigotas intracelulares.....	45

Figura 25 – Avaliação do mecanismo de ação da EGCG em amastigota intracelular.....	47
Figura 26 – Atividade <i>in vivo</i> da EGCG.....	49
Figura 27 – Avaliação toxicológica.....	50
Figura 28 – Mecanismo de ação proposto da EGCG em promastigota e amastigota de <i>L. braziliensis</i>.....	60

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Espécies causadoras de Leishmaniose em seres humanos.....	7
Tabela 2 – Análise do índice de variação (IV) de promastigotas tratadas com EGCG.....	39
Tabela 3 – Índice de seletividade.....	43

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

- $\Delta\Psi_m$ - Potencial de membrana mitocondrial
- 2TNB⁻ - 2-nitro-5-ácido tiobenzóico
- ALT - Alamina aminotransferase
- AST - Aspartato aminotransferase
- ATP - Adenosina trifosfato
- DNA - Ácido Desoxirribonucléico
- DTN - Doenças Tropicais Negligenciadas
- DTNB - Ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)
- EDTA - Ácido etilenodiamino tetra-acético
- EGCG - Epigalocatequina-3-galato
- ERO - Espécies Reativas de Oxigênio
- FCCP - Carbonil cianeto 4-(trifluorometoxi) fenil hidrazona
- GSH - Glutathiona
- GTP - Guanosina trifosfato
- H₂DCFDA - Diacetato de diclorodihidrofluoresceína
- H₂O₂ - Peróxido de hidrogênio
- HBSS - Solução salina balanceada de Hanks
- IC₅₀ - Concentração que inibe 50% da atividade testada
- IDH - Índice de Desenvolvimento Humano
- IF - Índice de Infecção
- IFN- γ - Interferon gama
- IP- Intraperitoneal
- IV - Índice de Variação
- JC-1 - Iodeto de 5,5', 6,6'-tetracloro1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolcarbonianina
- LCL - Leishmaniose Cutânea Localizada
- LDA - Diluição limitante
- LDC - Leishmaniose Difuso-Cutânea
- LV - Leishmaniose Visceral
- NADP⁺ - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina
- NADPH - Fosfato de dinucleótido de nicotinamida e adenina reduzido

OMS - Organização Mundial da Saúde
PBS - Solução tamponada com fosfato
PEG-catalase - Catalase polietilenoglicol
RPMI - Roswell Park Memorial Institute
SFB - Soro Fetal Bovino
T(S)₂ - Tripanotiona oxidada
T(SH)₂ - Tripanotiona reduzida
TDR - Programa Especial da Investigação e Capacitação no Domínio das Doenças
Tropicais
TGO - Transaminase glutâmico-oxalacética
TGP - Transaminase glutâmico-pirúvica
TR - Tripanotiona Redutase
UNICEF - Fundo das Nações Unidas para a Infância

1 INTRODUÇÃO

1.1 Doenças tropicais negligenciadas

Doenças infecciosas causadas por parasitos são uma grande ameaça para a humanidade. Em todo o mundo, mais de 1 bilhão de pessoas estão diretamente expostas a parasitos tropicais que são causadores de uma grande gama de doenças, como por exemplo: leishmaniose (*Leishmania spp.*), tripanossomíases (*Trypanosoma spp.*), esquistossomose (*Schistosoma spp.*), filariose linfática (*Brugia sp.*, *Wuchereria bancrofti*), oncocercose (*Onchocerca volvulus*), malária (*Plasmodium spp.*) dentre outras (Ndjonka e cols, 2013). De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), essas doenças fazem parte do programa de doenças tropicais negligenciadas (DTNs).

As DTNs estão diretamente relacionadas a condições precárias de vida e baixo índice de desenvolvimento humano (IDH). No Brasil ocorre uma maior prevalência dessas doenças em regiões menos favorecidas economicamente, principalmente nas regiões Norte e Nordeste (Boelaert e cols, 2010; Lindoso e Lindoso, 2009). Em 1975 foi criado o Programa Especial de Investigação e Capacitação no Domínio das Doenças Tropicais (*Training in Tropical Diseases – TDR*), co-patrocinado pelo Fundo das Nações Unidas para a Infância (UNICEF), Banco Mundial e OMS. O TDR é um programa de colaboração científica que ajuda a coordenar, apoiar e influenciar os esforços globais para combate das principais doenças dos países pobres e desfavorecidos (TDR, 2010).

1.2 Leishmanioses

As leishmanioses estão amplamente distribuídas ao redor do mundo (Figura 1; Figura 2). Presentes em 98 países, causam cerca de 1,6 milhão de novos casos por ano (500 mil casos de leishmaniose visceral e 1,1 milhão casos de leishmaniose tegumentar), provocando cerca de 60 mil óbitos (WHO, 2010; Alvar e cols, 2012).

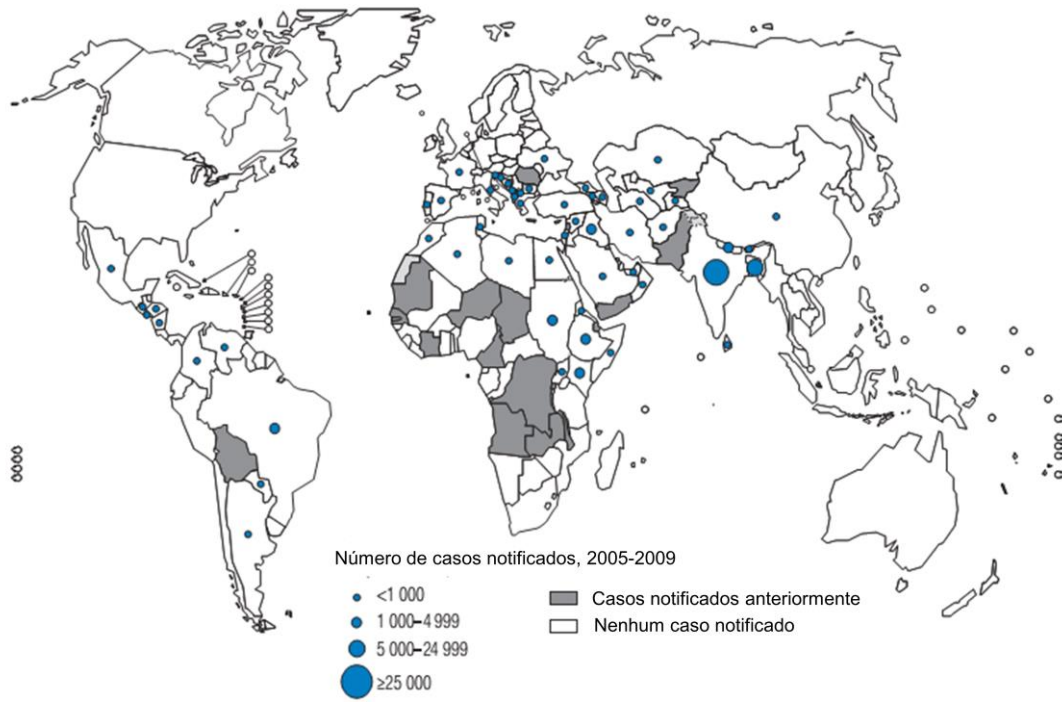


Figura 1 - Distribuição da leishmaniose visceral ao redor do mundo. (Adaptado de WHO, 2010)

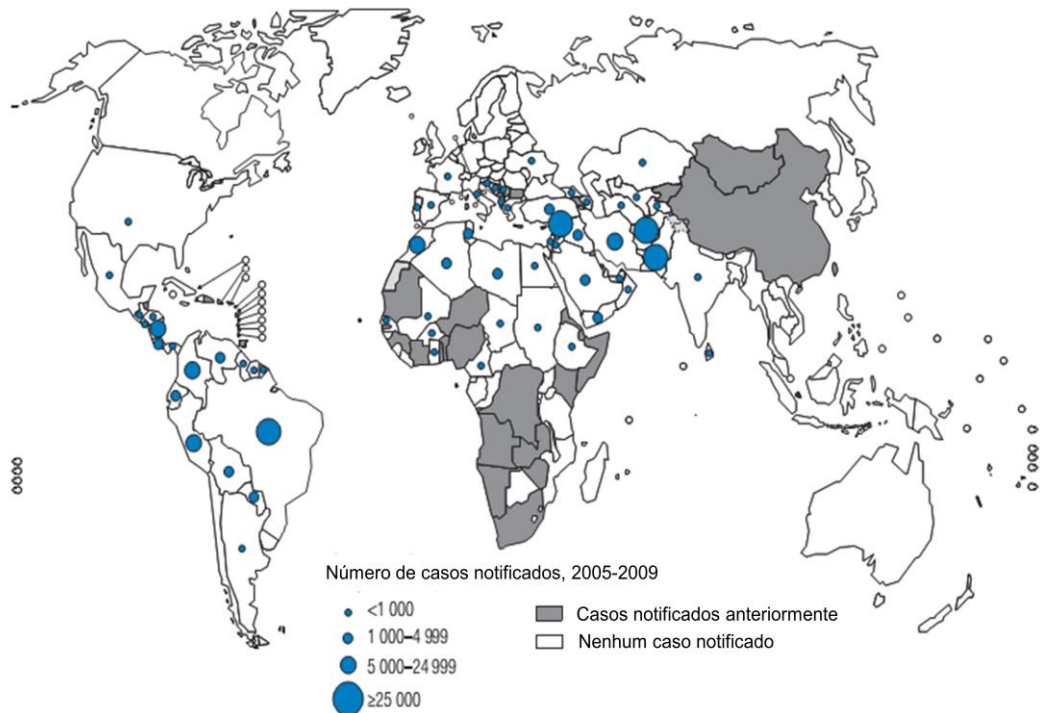


Figura 2 - Distribuição da leishmaniose tegumentar ao redor do mundo. (Adaptado de WHO, 2010)

1.2.1 Vetores da leishmaniose

As formas clínicas das leishmanioses são causadas por mais de 20 espécies do gênero *Leishmania* que são transmitidas durante o repasto sanguíneo da fêmea do flebotomíneo (ordem Diptera, família Psychodidea, subfamília Phlebotominae). São insetos de pequeno porte, medindo de 2 a 3 mm, apresentando em seu corpo intensa pilosidade. Somente as fêmeas dos flebotomíneos são hematófagas, mas tanto machos quanto as fêmeas, se alimentam de seiva vegetal, sua principal fonte de carboidratos (Vannier-Santos e cols. 2002). Dois gêneros de flebotomíneos são responsáveis por transmitir a *Leishmania* para os hospedeiros vertebrados: *Lutzomyia*, no Novo Mundo (Figura 3a) e *Phlebotomus*, no Velho Mundo (Figura 3b) (Shukla e cols, 2010). Os hospedeiros vertebrados incluem grandes variedades de mamíferos: roedores, endentados (tatu, tamanduá, preguiça), marsupiais (gambá), canídeos e primatas, incluindo o homem (Grimaldi e cols, 1991; Neuber, 2008).

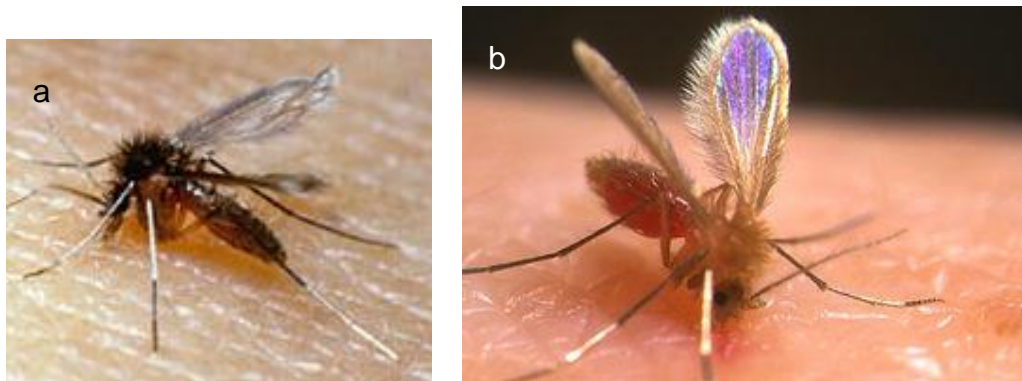


Figura 3 – Vetores da leishmaniose. (a) *Lutzomyia*; (b) *Phlebotomus*
(Disponível em: <http://www.stanford.edu/class/humbio103/ParaSites2003/Leishmania/Vector%20and%20Reservoirs1.html>)

1.2.2 Parasito *Leishmania*

Os protozoários parasitos do gênero *Leishmania* foram descritos pela primeira vez por Leishman e Donovan, no final do século XIX (Rey, 2008). Estes parasitos são flagelados da família Trypanosomatidae e ordem Kinetoplastida. Essa ordem é caracterizada por apresentar uma única mitocôndria rica em DNA mitocondrial, denominado cinetoplasto. (Simpson, 1987). Os tripanosomatídeos apresentam uma rede de microtúbulos subpeliculares bastante rígida, conferindo a estes protozoários

formas celulares bem definidas durante seu ciclo biológico: amastigotas e promastigotas (Figura 4) (Chang e Fong, 1983). As formas amastigotas apresentam-se tipicamente ovóides ou esféricas. A membrana plasmática, o citoplasma, um único núcleo esferóide ou ovóide e o cinetoplasto em forma de bastão pequeno – situado na maioria das vezes próximo do núcleo – são distintos da forma promastigota. Não há flagelo livre, apenas um rudimento que está presente na bolsa flagelar, uma invaginação da superfície do parasito. As formas promastigotas são alongadas, de sua região anterior (bolsa flagelar) emerge um flagelo livre. No citoplasma, o núcleo assemelha-se ao existente na forma amastigota. O cinetoplasto é geralmente ovóide e situado entre a extremidade da região anterior e o núcleo, variando bastante em sua posição (Vannier-Santos e cols, 2002).

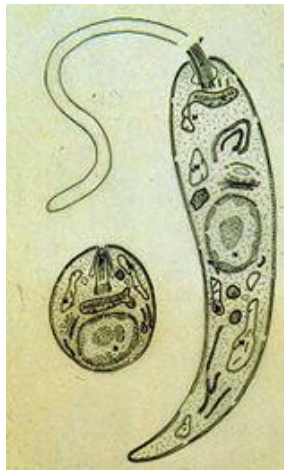


Figura 4 – Morfologia das formas evolutivas de *Leishmania*. Figura esquemática mostrando o núcleo, cinetoplasto, flagelo e mitocôndria de forma amastigota e promastigota. (Disponível em: <http://www.dbbm.fiocruz.br/tropical/leishman/leishext/html/morfologia.htm>)

A sistemática do gênero *Leishmania* apresenta grande complexidade, com a introdução de dois níveis intermediários de subgênero e complexo, conforme ilustrado na Figura 5.

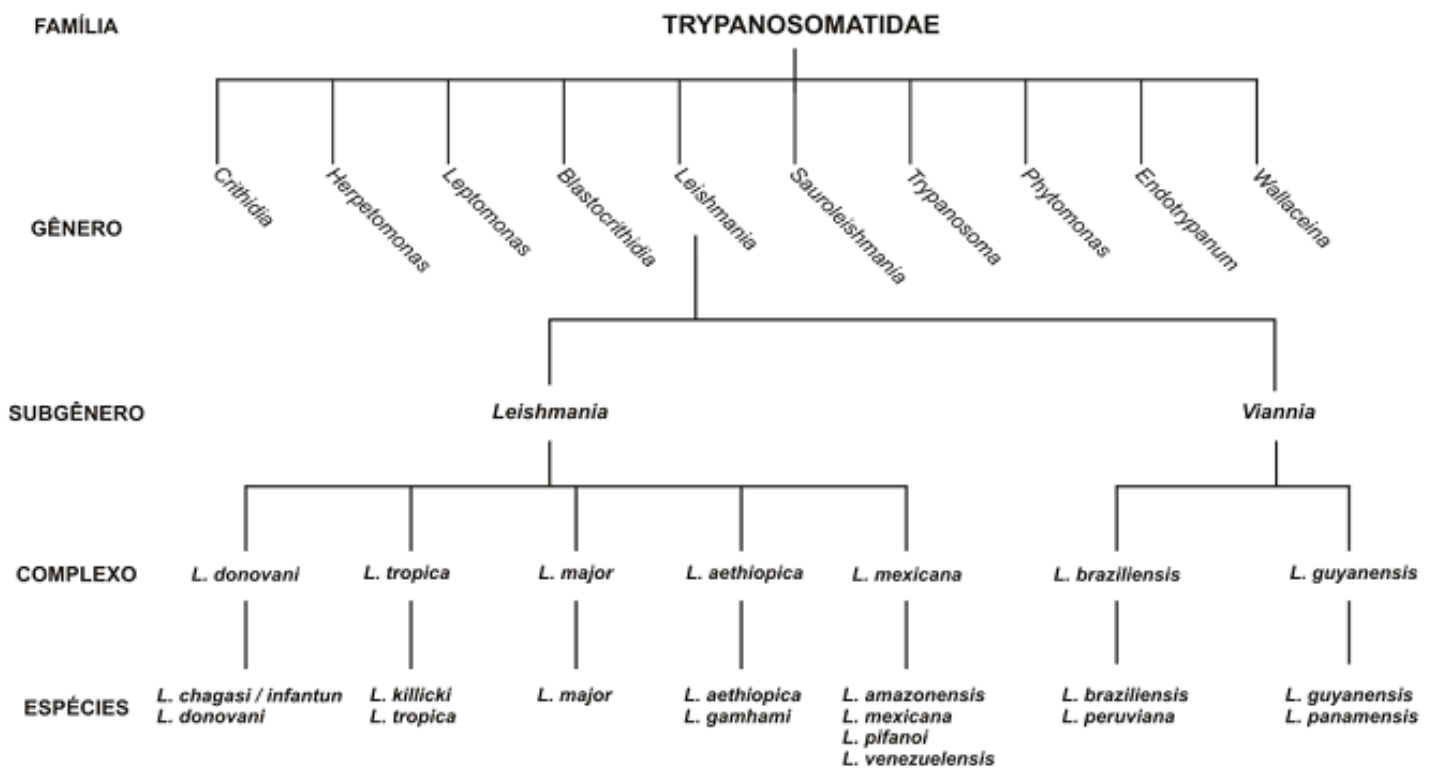


Figura 5 - Taxonomia da família Trypanosomatidae. (Adaptado de Chan-Bacab e Peña-Rodrigues, 2001).

1.2.3 Ciclo biológico

Uma característica marcante, comum a todas as espécies de *Leishmania*, é a capacidade de estabelecer o parasitismo intracelular, preferencialmente em fagócitos mononucleares do hospedeiro vertebrado (Chang 1983; Chang e Fong 1983; van Zandbergen e cols, 2004). No hospedeiro vertebrado, o parasito apresenta-se sob a forma amastigota, que se multiplica por divisão binária, dentro do fagolisossoma do macrófago infectado. Este macrófago rompe-se, liberando os amastigotas, podendo infectar novos macrófagos. Durante o repasto sangüíneo dos flebotomíneos, os amastigotas presentes nos macrófagos da pele, no líquido intersticial (devido ao rompimento dos macrófagos) ou no sangue (no plasma ou no interior de monócitos, no caso de calazar) ao serem sugados, se transformam em promastigotas procíclicos, os quais se multiplicam por divisão binária, no trato digestivo do inseto vetores, povoando as regiões do proventrículo e do esôfago. Os promastigotas sofrem subseqüentes modificações morfológicas e bioquímicas,

passando de um estágio não infectivo (procíclico) para um infectivo (metacíclico) – este processo é denominado metaciclogênese –, migrando para a faringe (Sacks, 1989; Sacks e Kamhawi 2001). Quando o vetor infectado realiza o repasto sanguíneo, regurgita os promastigotas infectivos (metacíclicos), então estas formas serão fagocitadas pelas células fagocitárias mononucleares do hospedeiro, os macrófagos. Durante a fagocitose, os promastigotas são englobados em fagossomos que se fundem com endossomos e lisossomos, formando fagolisossomos ou vacúolos parasitóforos (Vannier-Santos e cols, 2002). Dentro do fagolisossomo os promastigotas se transformam em amastigotas, que se multiplicam e causam a lise do macrófago. Estes amastigotas livres poderão infectar outros macrófagos continuando o ciclo (Lainson e cols, 1987; Glew e cols, 1988). Além do repasto sanguíneo, transfusão de sangue, hemodiálise, transplante e a transmissão congênita foram relatados como formas de transmissão da leishmaniose (Vannier-Santos e cols, 2002).

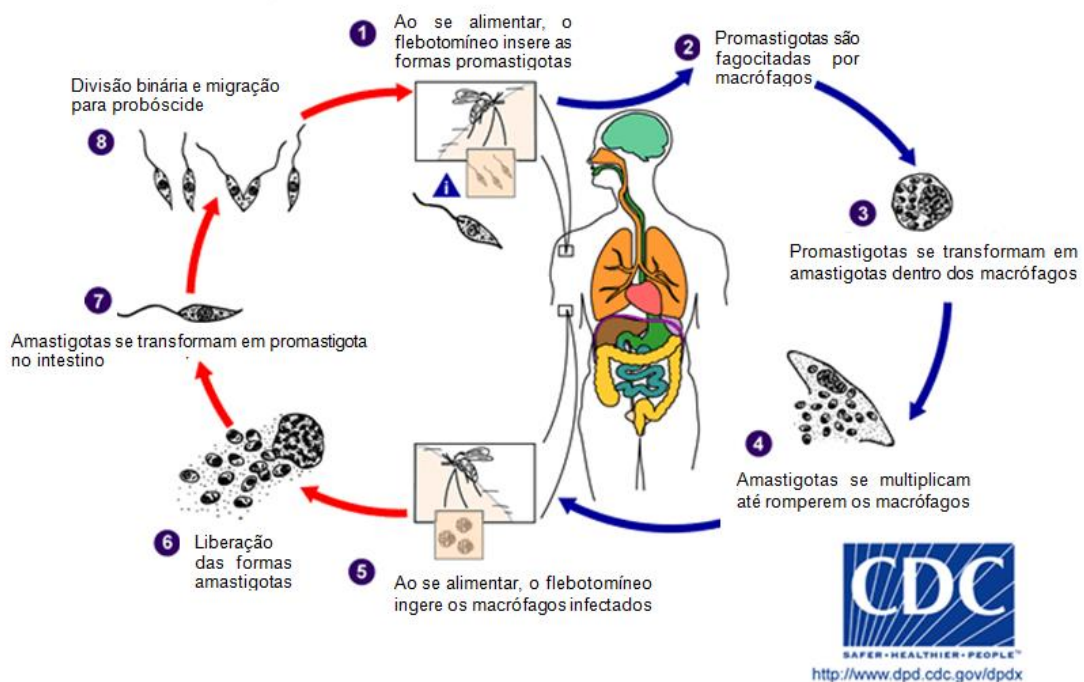


Figura 6 - Ciclo biológico da *Leishmania*

(Adaptado e disponível em: http://dpd.cdc.gov/dpdx/HTML/ImageLibrary/Leishmaniasis_il.htm)

1.2.4 Manifestações clínicas das leishmanioses

As leishmanioses apresentam uma variedade de manifestações clínicas que variam de simples lesões cutâneas à doença sistêmica fatal. No homem, a leishmaniose pode apresentar duas manifestações clínicas distintas: leishmaniose tegumentar e leishmaniose visceral. A leishmaniose tegumentar compreende várias formas clínicas que dependem da espécie de *Leishmania* envolvida, bem como o tipo de resposta imune do hospedeiro. Já a visceral, forma mais grave da doença, pode levar o indivíduo acometido a óbito caso não haja tratamento (El-On, 2009; Santos e cols, 2008).

Na Tabela 1 são descritas as espécies de *Leishmania* que estão relacionadas com a sua forma clinica, bem como a sua distribuição geográfica. No Brasil, as espécies de maior importância são *Leishmania braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. amazonensis* e *L. infantum* (syn *L. chagasi*).

Tabela 1 – Espécies causadoras de Leishmaniose em seres humanos.

	Tropismo principal	Principal forma clínica	Distribuição geográfica
Novo Mundo			
<i>L. (Viannia) braziliensis</i>	Dermotrópica/Mucotrópica	LCL, mucosa	América do Sul, partes da América Central, México
<i>L. (Viannia) panamensis</i>	Dermotrópica/Mucotrópica	LCL, mucosa	Norte da América do Sul e sul da América Central
<i>L. (Viannia) peruviana</i>	Dermotrópica	LCL	Peru
<i>L. (Viannia) guyanensis</i>	Dermotrópica	LCL	América do Sul
<i>L. (Viannia) lainsoni</i>	Dermotrópica	LCL	América do Sul
<i>L. (Viannia) colombiensis</i>	Dermotrópica	LCL	Norte da América do Sul
<i>L. (Leishmania) amazonensis</i>	Dermotrópica	LCL, LCD	América do Sul
<i>L. (Leishmania) mexicana</i>	Dermotrópica	LCL, LCD	América Central, México, EUA

<i>L. (Leishmania) pifanoi</i>	Dermotrópica	LCL	América do Sul
<i>L. (Leishmania) venezuelensis</i>	Dermotrópica	LCL	Norte da América do Sul
<i>L. (Leishmania) garnhami</i>	Dermotrópica	LCL	América do Sul
Velho Mundo			
<i>L. (Leishmania) aethiopica</i>	Dermotrópica	LCL, LCD	Etiópia, Quênia
<i>L. (Leishmania) killicki</i>	Dermotrópica	LCL	Norte da África
<i>L. (Leishmania) major</i>	Dermotrópica	LCL	Ásia Central, norte da África, Oriente Médio, oeste da África
<i>L. (Leishmania) tropica</i>	Dermotrópica	LCL	Ásia Central, Oriente Médio, parte do norte da África, sudeste da Ásia
<i>L. (Leishmania) donovani</i>	Viscerotrópica/Dermotrópica	Visceral, LCL	África, Ásia Central, sudeste da Ásia
Novo e Velho Mundo			
<i>L. (Leishmania) infantum*</i>		Visceral, LCL	Europa, norte da África, América Central, América do Sul

(Adaptado de Reithinger e cols, 2007; WHO, 2010). LCL = Leishmaniose Cutânea Localizada. LCD = Leishmaniose Cutâneo-Difusa. Sudeste da Ásia inclui Índia e China. Em negrito, principais espécies de *Leishmania* do Brasil. *syn *L. (Leishmania) chagasi*

A leishmaniose cutânea localizada (LCL) é a forma mais prevalente da doença, causada principalmente pelas espécies de *Leishmania* dermatotrópicas (Goto e Lindoso, 2010). As lesões usualmente são encontradas em partes expostas da superfície corporal como mãos, rosto ou pernas (Figura 7a) (Neuber, 2008; David e Craft, 2009). Essa forma clínica tem como seu primeiro sinal um pequeno eritema inchado e avermelhado que surge após um período variável no local da inoculação. O eritema se desenvolve em uma pápula e em seguida como um nódulo que, progressivamente ulcera em um período de duas semanas a seis meses,

transformando-se em uma lesão característica da LCL. As lesões se apresentam como úlcera de superfície plana com margens aumentadas e bem delimitadas que podem se tornar auto-resolutivas, mas em alguns casos podem não curar espontaneamente (Reithinger e cols, 2007)

A forma disseminada da leishmaniose cutânea é relativamente rara, podendo ser observada em até 2% dos casos (Goto e Lindoso, 2010). Tem sido descrito que esta síndrome está relacionada com associação de *L. braziliensis*, *L. panamensis*, *L. guyanensis* com infecção de *L. amazonensis* (WHO, 2010). Esta forma de apresentação é caracterizada pelo aparecimento de múltiplas lesões papulares e de aparência acneiforme que acometem duas ou mais áreas não contíguas do corpo (Figura 7b). As razões para o desenvolvimento da leishmaniose disseminada ainda não foram estabelecidas, entretanto, fatores do parasito, hospedeiro e ambientais podem favorecer a disseminação do parasito no hospedeiro (Turetz e cols, 2002).

A leishmaniose mucocutânea é caracterizada pela destruição das cavidades oral, nasal e faringea, frequentemente envolvendo lesões desfigurantes (Figura 7c). Na maioria dos casos, ela resulta da evolução crônica da forma cutânea, curada sem tratamento ou com tratamento inadequado (Goto e Lindoso, 2010; Neuber 2008). Infecções causadas por *L. braziliensis* podem sofrer metástase para membrana mucosa, dando origem à forma mucocutânea da doença (Neuber, 2008). Entretanto, há descrições de casos desse tipo de manifestação associados à *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. amazonensis* e *L. major* (Goto e Lindoso, 2010).

A leishmaniose cutâneo-difusa (LCD) constitui uma forma clínica rara, porém grave, que ocorre em pacientes com anergia e deficiência específica na resposta imune celular a antígenos de *Leishmania* (Bailey e cols, 2007; Ministério da Saúde, 2007). Inicia-se com uma lesão única que evolui de forma lenta com formação de placas e múltiplas nodulações espalhadas pelo corpo, que se diferem das lesões da forma disseminada por serem não-ulceradas, resultante da disseminação do parasito através dos vasos linfáticos, ou por migração de macrófagos infectados (Figura 7d) (Neves, 2005).

A forma clínica mais grave dessa doença é conhecida como leishmaniose visceral (LV). A sua manifestação depende do tipo de *Leishmania* envolvida e do

estado imunológico do hospedeiro (Neuber, 2008). Devido ao viscerotropismo desta espécie, os indivíduos acometidos apresentam comprometimento de diversos órgãos como baço, fígado, linfonodos e medula óssea (Figura 7e). Caracteriza-se por febre irregular de intensidade média e de longa duração, esplenomegalia e hepatomegalia, podendo provocar óbito nos casos não tratados (Maltezu, 2010; Osman e cols, 2000).



Figura 7 – Formas clínicas da leishmaniose. (a) Leishmaniose cutânea localizada; (b) Leishmaniose cutânea disseminada; (c) Lesão de leishmaniose mucocutânea; (d) leishmaniose cutâneo-difusa; (e) leishmaniose visceral. (Neuber, 2008; Ministério da Saúde, 2007)

1.3 Quimioterapia

As opções terapêuticas utilizadas para o controle das leishmanioses estão associadas a diversos problemas, como baixa eficácia, alta toxicidade, dificuldade

de administração, altos custos e crescente resistência. Apesar das diferenças existentes entre as várias espécies de *Leishmania* à suscetibilidade a fármacos e às várias formas de manifestação da doença, os medicamentos usualmente empregados nos tratamentos são os mesmos para as várias formas da doença (Goto e Lindoso, 2010).

1.3.1 Antimoniais pentavalentes

O tártaro emético, um antimonial trivalente utilizado empiricamente há séculos para diversas doenças, foi instituído como tratamento da leishmaniose em 1912 por Gaspar Vianna, médico e pesquisador do Instituto de Patologia Experimental de Manguinhos, atual Instituto Oswaldo Cruz (Vianna, 1912). Desde então, os antimoniais sofreram várias modificações para diminuir seus efeitos tóxicos. A partir da década de 40, o tratamento de primeira escolha contra esta infecção passou a basear-se no uso de antimoniais em sua forma pentavalente, mais refinada e com efeitos colaterais menos severos que os antimoniais trivalentes (Goodwin, 1995; Singh e cols, 2004). Atualmente, os antimoniais são disponibilizados comercialmente em duas formulações: antimoniato de N-metilglucamina (antimoniato de meglumina) (Glucantime®) que contém 81mg SB⁵⁺/mL e o estibogluconato de sódio (Pentostam®) que contém 100mg SB⁵⁺/mL (WHO, 2010).

Ainda hoje, o tratamento de todos os tipos de leishmaniose baseia-se nos antimoniais pentavalentes, administrados por via intramuscular ou endovenosa, sendo distribuído em alta concentração no fígado e baço. No fígado, eles são biotransformados em seu estado trivalente e cerca de 50% do antimônio é excretado a partir de 24 a 76 horas pela urina (Krauth-Siegel e Inhoff, 2003). O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes ainda não foi completamente elucidado, mas sua ação leishmanicida depende da redução *in vivo* da forma pentavalente para a forma trivalente. Entretanto, há indicativos de que este composto iniba enzimas glicolíticas e a oxidação de ácidos graxos nas formas amastigotas do parasito, reduzindo a formação de adenosina trifosfato (ATP) e guanosina trifosfato (GTP) (Singh e cols, 2004)

A eficácia dos antimoniais varia de acordo com a espécie de *Leishmania* envolvida na infecção e com a manifestação clínica da doença (Goto e Lindoso, 2010). Casos de resistência aos antimoniais pentavalentes são frequentemente relatados. Inicialmente, a dosagem de antimonial indicada era de 10mg/kg durante 6 a 10 dias, com uma taxa de cura maior que 90%. Entretanto, após a primeira falha do tratamento ocorrida na Índia em 1980, altas doses e esquemas de tratamento prolongados (20mg/kg por 30 dias) foram gradualmente introduzidos. Esse evento ocorreu simultaneamente com o aumento das taxas de resistência a esse medicamento (Maltezou, 2010). Os antimoniais são medicamentos injetáveis, que devem ser administrados diariamente por longos períodos, o que frequentemente requer hospitalização, acarretando desconforto para o paciente e alto custo. Além disso, causam vários efeitos colaterais, tais como: náusea, dor abdominal, mialgia, nefrotoxicidade, pancreatite, arritmia cardíaca e hepatite, levando à redução ou interrupção do tratamento (Gasser e cols, 1994; Sundar e cols, 1998). A persistência dos antimoniais no tratamento da leishmaniose durante tanto tempo, não deve ser interpretada como uma vantagem. Ao contrario, pois apresentam além dos inconvenientes já citados, várias limitações que tem comprometido sua utilização, como eficácia variável em relação à leishmaniose cutânea e visceral, além dos casos de resistência (Croft e Coombs, 2003).

1.3.2 Anfotericina B

A anfotericina B é um antibiótico e antifúngico poliênico também utilizado no tratamento da leishmaniose sendo o medicamento de primeira escolha em algumas partes do mundo (Goto e Lindoso, 2010). Sua atividade leishmanicida é atribuída a sua afinidade pelo ergosterol, um esterol amplamente encontrado na membrana de *Leishmania* e ausente em membranas de células de mamíferos formando poros na membrana do parasito, levando-os a morte (Singh e Sivakumar, 2004). No entanto, esse composto também se liga em menores proporções ao colesterol presente nas membranas celulares de mamíferos, induzindo efeitos adversos sobre os pacientes, como: anafilaxia, trombocitopenia, dores generalizadas, calafrios, febre, flebite, anemia, convulsões, anorexia e nefrotoxicidade (Carvalho e cols., 2000).

A anfotericina B é administrada através de infusão venosa e produz febre, calafrio e dor nas articulações. A sua utilização requer hospitalização prolongada e um acompanhamento rigoroso (Mishra e cols, 2007). A anfotericina B constitui uma opção em pacientes que apresentam resistência ao tratamento com antimoniais. O principal fator limitante quanto ao uso deste fármaco é sua toxicidade. Entretanto, novas formulações lipídicas desse fármaco possibilitaram uma diminuição dos efeitos tóxicos e maior efetividade. Estas formulações incluem a anfotericina B lipossomal (L-AmB: Ambisome®), dispersão coloidal de anfotericina B (ABCD: Anfocil®) e complexo lipídico de anfotericina B (ABL: Abelcet®) (Mishra e cols, 2009; Singh e cols, 2009). Formulações lipossomais de anfotericina B constituem o tratamento de primeira escolha em países endêmicos no sul da Europa e em outros países desenvolvidos. Entretanto, essas formulações apresentam um alto custo, dificultando sua utilização em países pobres, nos quais a escolha do tratamento depende mais do custo do que da eficácia ou toxicidade (Maltezou, 2010).

1.3.3 Pentamidina

A pentamidina é uma poliamina administrada por via parenteral, utilizada como segunda escolha no tratamento de pacientes com leishmaniose visceral resistentes aos antimoniais (Piscopo e Mallia, 2006) e no tratamento da leishmaniose cutânea e visceral em algumas regiões do Novo Mundo (Goto e Lindoso, 2010), podendo também ser utilizada como o medicamento de primeira escolha (David e Craft, 2009). A pentamidina desencadeia a morte do parasito por interferir na síntese do seu DNA, induzindo modificações na morfologia do cinetoplasto e fragmentação mitocondrial (Goto e Lindoso, 2010; David e Craft, 2009). A pentamidina é comercializada em duas formulações: Isotionato (di-β-hidroxietano sulfonato) e Mesilato (di-β-hidroximetilssulfonato) (Ministério da Saúde, 2007). Entretanto, o uso deste fármaco tem sido limitado devido à sua toxicidade levando a sintomas como dores locais, dores de cabeça, hipotensão, síncope, hipoglicemia, náusea, vômitos, diarreia e cardiotoxicidade (Goto e Lindoso, 2010; David e Craft, 2009; Ministério da Saúde, 2007).

1.3.4 Miltefosina

A descoberta da miltefosina representou um avanço no tratamento da leishmaniose nos últimos anos por possibilitar a administração por via oral. O mecanismo de ação exato da miltefosina permanece desconhecido. Esse composto se liga à membrana plasmática, é internalizado pela célula do hospedeiro e induz alterações significativas em seu metabolismo (Berman, 2008; Paris e cols, 2004).

Os problemas relacionados à ampla utilização da miltefosina incluem seu potencial teratogênico e a ocorrência de resistência. A resistência à miltefosina pode aparecer facilmente durante o tratamento devido a mutações pontuais, que levam a diminuição no acúmulo do composto no interior da célula (Maltezou, 2010). Além disso, a miltefosina desencadeia efeitos colaterais adversos durante o tratamento, como náuseas, vômitos, enjôos, dores de cabeça e diarreia. Ressalta-se ainda, o alto custo deste composto como um fator que limita sua utilização (Mishra e cols, 2009; Singh e cols, 2009).

1.3.5 Paramomicina

A paramomicina é um aminoglicosídeo com atividade leishmanicida, que inibe a síntese protéica e altera a fluidez e permeabilidade de membrana. Estudos *in vitro* indicam que a paramomicina induz a perda do potencial de membrana mitocondrial em *L. donovani*, sugerindo que a mitocôndria seja a organela alvo deste composto. A paramomicina tem sido utilizada por via parenteral no tratamento da leishmaniose cutânea no Novo e Velho Mundo. Quando associada com cloreto de metilbenzetônio, o uso tópico da paramomicina foi eficaz no tratamento da leishmaniose cutânea do Velho Mundo. Quando administrada de maneira parenteral, a paramomicina também se mostrou efetiva no tratamento da leishmaniose cutânea localizada do Novo Mundo (Goto e Lindoso, 2010). Os efeitos adversos encontrados nos pacientes tratados com essas formulações foram erupções cutâneas e prurido local (Sundar e Chakravarty, 2008).

1.3.6 Tratamentos alternativos

Diversos outros fármacos têm sido utilizados como medicamentos alternativos para o tratamento das leishmanioses. Os azóis, inicialmente desenvolvidos para o tratamento de infecções fúngicas tem sido usados para o tratamento da leishmaniose cutânea. Alguns estudos demonstraram eficácia do fluconazol, cetoconazol e itraconazol no tratamento da leishmaniose, com uma taxa de cura que variou entre 55% e 79% no Velho Mundo. O alopurinol, um composto utilizado em associação com os antimoniais, também apresenta resultados bastante divergentes. A dapsona tem sido efetiva no tratamento da leishmaniose no Velho mundo e a rifampicina utilizada sozinha ou em associação com outros compostos apresenta eficácia variada (Goto e Lindoso, 2010; Llanos-Cuentas e cols, 1997; Dogra, 1991).

1.4 Desenvolvimento de fármacos

As doenças tropicais negligenciadas são responsáveis por uma alta taxa de mortalidade e morbidade em cada ano em países endêmicos. Ainda não há vacinas e a quimioterapia permanece como a única opção para o controle da infecção (Ndjonka, 2013; Cavalli e Bolognesi, 2009), portanto há uma necessidade urgente de descobrir novos alvos e estratégias terapêuticas contra essas ameaças à saúde humana. A situação é agravada pelo fato de que a maioria das pessoas que vivem em países endêmicos tem um perfil de baixa renda, fazendo com que o mercado farmacêutico para o desenvolvimento de novos medicamentos seja pouco atrativo para o setor privado de pesquisa (Ndjonka, 2013).

1.5 Produtos naturais com atividade leishmanicida

Nas últimas décadas a pesquisa básica forneceu um impulso à descoberta de fármacos leishmanicidas, incluindo o conhecimento da biologia, bioquímica e genoma do parasito, revolução nas técnicas químicas, avanços nas ferramentas de bioinformática, parcerias e consórcios para apoiar o desenvolvimento de novos agentes leishmanicidas. A evolução de fármacos naturais tem uma importância relevante na busca de novas alternativas terapêuticas, portanto fontes naturais,

como plantas, representam uma grande oportunidade para o descobrimento de novos medicamentos para o tratamento de algumas doenças parasitárias (Coura e de Castro, 2002; Kayser e cols 2003)

Hoje, várias substâncias originadas de plantas são aplicadas em terapias, por exemplo, o paclitaxel e alcalóides da vincristina que são utilizados no tratamento do câncer, ou da artemisinina com potente atividade antimalarial. As plantas são fontes valiosas para a triagem de metabolitos secundários bioativos, que produzem compostos farmacologicamente úteis. Estas substâncias podem ser fonte de conhecimento para a síntese de derivados com melhor perfil terapêutico (Polonio e Efferth, 2008; Ndjonka, 2013). A busca por novos medicamentos a partir de fontes naturais tem sido uma abordagem bem sucedida na detecção de compostos para algumas doenças parasitárias. Uma série de flavonóides já foram descritos por possuírem importantes atividades antiprotozoárias, dentre eles se destacam a quercetina, luteolina e outros, por apresentarem atividade contra *Toxoplasma*, *Plasmodium*, *Trypanosoma* e *Leishmania* (Fonseca-Silva e cols, 2011; Lehane e Saliba, 2008; Inácio e cols, 2012; Güida e cols, 2007)

1.5.1 Flavonóides

Os flavonóides são um grupo grande e complexo de compostos que pertencem ao grupo dos polifenóis (Hoensech e Oertel, 2012). Eles consistem em um núcleo flavan com dois anéis aromáticos ligados por três átomos de carbono (Figura 8) (Lehane e Saliba, 2008) São metabolitos secundários presentes em frutas, vegetais, vinho, chá e café e são classificados como: flavona, flavononas, flavonóides, flavonóis, antocianidinas, isoflavonóides e neoflavonóides, dentre outros (Hoensech e Oertel, 2012; Czaplínska e cols, 2012; Lehane e Saliba, 2008). Nas plantas, os flavonóides desempenham papéis importantes nas raízes, no transporte de auxina, no desenvolvimento da parte aérea, na polinização, na modulação de espécies reativas de oxigênio, no crescimento e proteção contra patógenos. Os flavonóides interagem com diversos alvos, atribuindo-lhes atividades antibacterianas, antifúngicas, antivirais, antiinflamatórias, antineoplásicas e tripanosomicidas s

(Weston e Mathesius, 2013; Aboulaila e cols, 2010; Güida e cols, 2007; Hoensch e Oertel, 2012; Lehane e Saliba, 2008).,

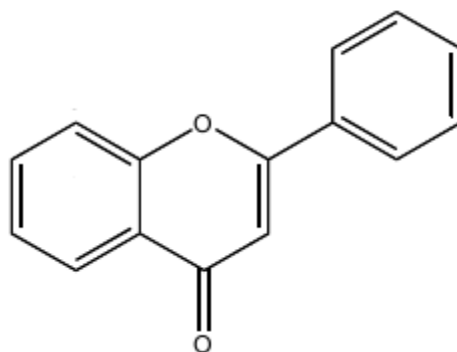


Figura 8 - Estrutura básica do flavonóide
(Adaptado de Lehane e Saliba, 2008)

1.5.2 Epigalocatequina-3-galato

A epigalocatequina-3-galato (EGCG) (Figura 9) é a principal catequina do chá verde, representando um total de 50%-80% de suas catequinas. O chá verde, originado a partir da *Camellia sinensis*, contém compostos biologicamente ativos, tais como polifenóis, metilxantinas e óleos essenciais. A maioria de suas ações biológicas, tais como a redução dos níveis de lipídios plasmáticos, efeitos antiinflamatórios, atividades antimicrobianas, antineoplásicas e antioxidantes, estão relacionadas com a fração de polifenóis, ou seja, as catequinas. Entre estes, a EGCG tem recebido considerável atenção por causa destes potentes efeitos terapêuticos (Khan e cols, 2006; Güida e cols, 2007).

O efeito da EGCG já foi demonstrado em *Babesia microti* (Aboulaila e cols, 2009), tripomastigotas sanguíneas de *Trypanosoma cruzi* e em modelo murino da doença de Chagas na fase aguda (Güida e cols, 2007), bem como em promastigotas de *L. amazonensis* (Inácio e cols, 2012). O seu mecanismo de ação ainda não está claramente definido, porém sabe-se que alguns flavonóides possuem a capacidade de gerar espécies reativas de oxigênio, causando danos mitocondriais. (Fonseca-Silva e cols, 2011; Verchooten e cols, 2012)

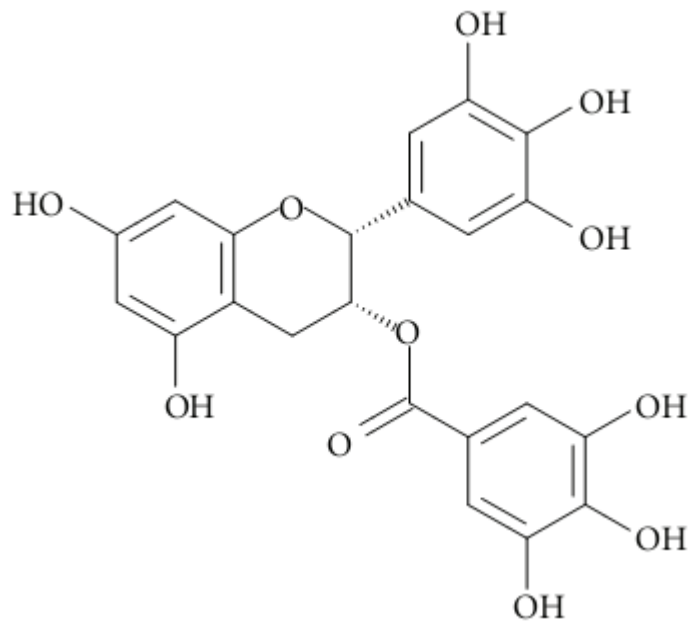


Figura 9 - Estrutura química da epigalocatequina-3-galato
(Adaptado de Maria-Groh e cols, 2012)

1.6 Mitocôndria e produção de espécies reativas de oxigênio

Parasitas da ordem apresentam uma única mitocôndria rica em DNA mitocondrial (kDNA). A informação contida no kDNA é essencial para a manutenção desses protozoários, pois representa cerca de 30% do DNA total da célula (Affranchino e cols, 1985; Fidalgo e Gille, 2011).



Figura 10 – Ultraestrutura celular de promastigota de *Leishmania amazonensis*. Morfologia das organelas celulares do parasito: núcleo (N), mitocôndria (M), cinetoplasto (K) e flagelo (F). A escala corresponde a 1µm (Inácio e cols, 2012).

A mitocôndria desempenha um importante papel no metabolismo energético e tem sido relatado como um excelente alvo em protozoários. A manutenção do potencial mitocondrial é fundamental para este processo metabólico, bem como para a sobrevivência de qualquer célula (Fidalgo e Gille, 2011; Mehta e Shaha, 2006). Estudos têm demonstrado que variações no potencial mitocondrial induzida por fármacos estão associadas com a inibição da proliferação celular em células de *Trypanosoma cruzi* (Menna-Barreto, 2009; Mukherjee, 2009), *L. donovani* (Mehta e Shaha, 2006) e *L. amazonensis* (Rodrigues e cols, 2007; Fonseca-Silva e cols, 2011; Inácio e cols, 2012).

Alterações na cadeia transportadora de elétrons podem resultar em liberação excessiva de espécies reativas de oxigênio (ERO). O desvio de elétrons a partir de complexos mitocondriais é a principal fonte de ERO endógena (Fidalgo e Gille, 2011). ERO agrupam substâncias químicas que são formadas após a uma redução incompleta de oxigênio. Dentre as principais ERO estão: ânion superóxido (O_2^-); peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e radical hidroxila (HO^*). Todas ERO apresentam elétrons desemparelhados que as tornam altamente reativas. Em níveis normais, esses radicais desempenham importantes papéis biológicos. No sistema imunológico, são necessários para eliminar micróbios, participam da resposta imune específica e no final de um processo inflamatório. Também estão envolvidas na função da tireóide (H_2O_2 é necessário como cofator da tiroperoxidase para a produção de hormônios) e na função cognitiva de pacientes com doença granulomatosa crônica. Por outro lado, o seu excesso pode gerar uma variedade de patologias que podem, inclusive, levar à morte (Figura 11) (Brieger e cols, 2012).

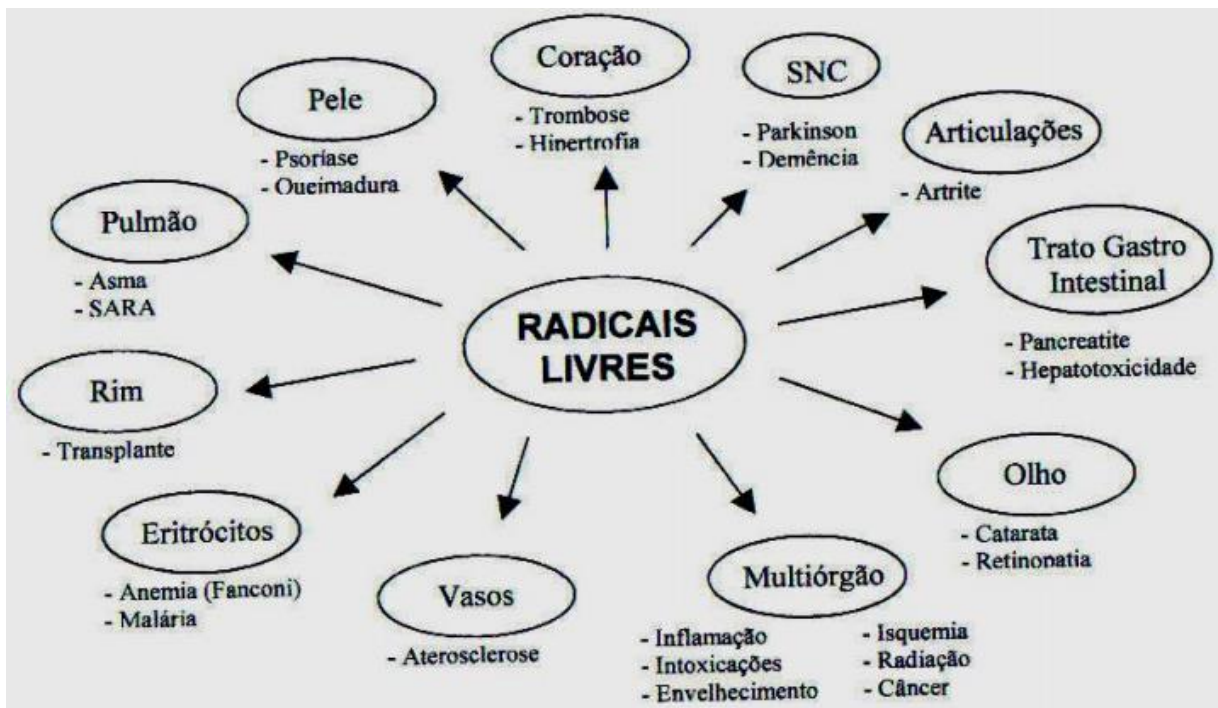


Figura 11 – ERO e a sua contribuição para diversas doenças. Adaptado de Brieger e cols, 2012.

Em parasitos do gênero *Leishmania*, a liberação de ERO possui uma capacidade poderosa de gerar danos celulares, direto nas proteínas, DNA e lipídios de membrana. Além de estarem diretamente envolvidas no processo de morte celular programada (Fidalgo e Gille, 2011).

1.7 Sistema antioxidante em tripanosomatídeos

O balanço redox possui diversas funções importantes para o parasito protozoário, e as enzimas envolvidas nesse sistema desempenham um papel vital no crescimento e desenvolvimento desses parasitos (Pal e Bandyopadhyay, 2012). O parasito *Leishmania* consegue sobreviver e proliferar mesmo estando em um ambiente hostil, causado pela produção de ERO e espécies reativas de nitrogênio pelos macrófagos do sistema imunológico do hospedeiro. Esse fato só é possível porque o parasito desenvolveu um mecanismo de defesa único para detoxificar esse ambiente (Singh e cols, 2012; Rodrigues e cols, 2012).

A tripanotona reduzida $[T(SH)_2]$ pode servir como doadora de elétrons em diversas vias (Figura 12). Uma delas aciona uma série de duas etapas de redução que resulta na decomposição de ERO, tais como o H_2O_2 e peroxonitrito (Irigoín e cols, 2008; Lazarin-Bidóia e cols, 2013; Hunter e cols, 1992; Krauth e Comini, 2008; Fairlamb e cols, 1989; Pal e Bandyopadhyay, 2012). A função de proteção celular desempenhada nos mamíferos pela glutathiona (GSH) é substituída, nos parasitos, pela $T(SH)_2$, a qual sob estresse oxidativo é convertida à tripanotona oxidada $[T(S)_2]$. De modo análogo ao sistema humano, a $T(S)_2$ é reciclada à $T(SH)_2$ pela enzima tripanotona redutase (TR), tendo como cofator NADPH. A tripanotona redutase (TR) é uma enzima presente apenas em tripanosomatídeos que participa do sistema redox e serve como substituto em muitas funções metabólicas e antioxidantes (Figura 13).

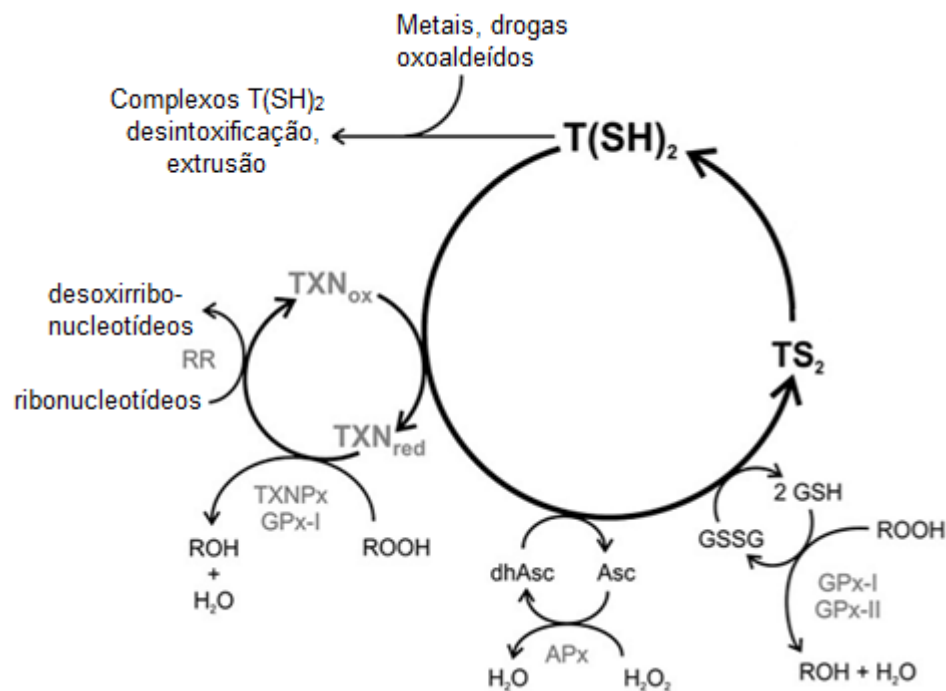


Figura 12 – Reações dependentes da tripanotona. A tripanotona é mantida na sua forma reduzida $[T(SH)_2]$, numa reação catalisada pela tripanotona redutase (TR). $T(SH)_2$ pode reduzir a triparredoxina (TXN), desidroascorbato (dhAsc) para ascorbato (Asc), glutathiona oxidada (GSSG) para a glutathiona reduzida (GSH). Através destes intermediários, $T(SH)_2$ participa na síntese de desoxirribonucleotídeos e decomposição de peróxidos. $T(S)_2$ também pode interagir diretamente com eletrófilos na desintoxificação do oxoaldeídos, metais e drogas. RR = redutase, ribonucleotídeo; ROOH = hidroperóxidos; $TXNPx$ = triparredoxina peroxidase; $GPx-I$, $GPx-II$ = glutathiona-peroxidase; APx = peroxidase dependente de ascorbato. Adaptado de Irigoín e cols, 2008.

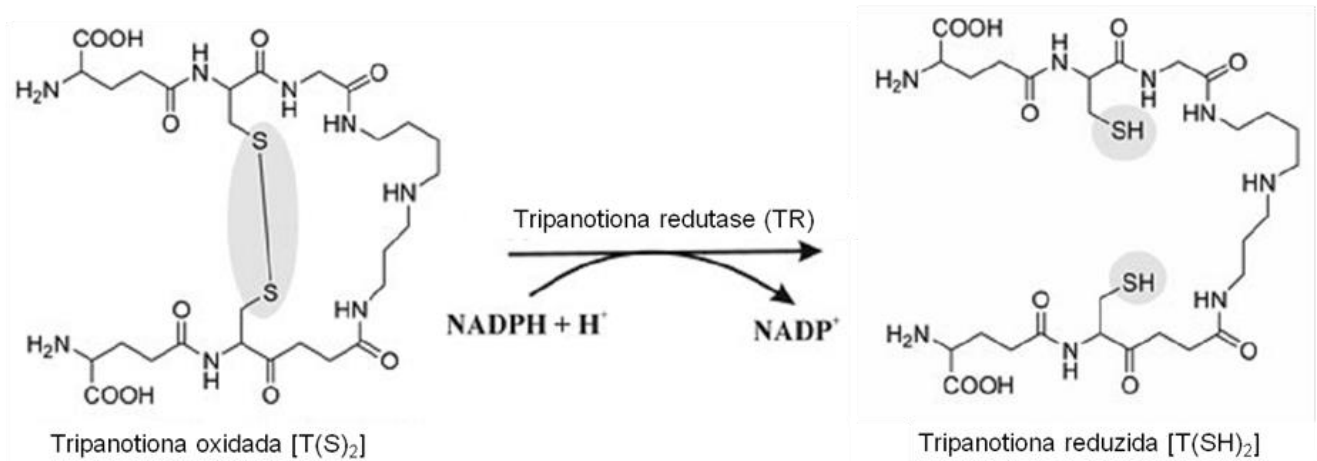


Figura 13 – Redução da tripanotione oxidada pela tripanotione reductase.

A ausência desta via em mamíferos e a sensibilidade dos tripanosomatídeos para o estresse oxidativo tornam a TR um excelente alvo para o desenvolvimento de fármacos antileishmanicidas (Singh e cols, 2012).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Avaliar a atividade *in vitro* e *in vivo* e o mecanismo de ação da epigalocatequina-3-galato (EGCG) sobre *Leishmania braziliensis*.

2.2 Objetivos Específicos

- Demonstrar o efeito da EGCG na proliferação celular dos promastigotas e amastigotas de *L. braziliensis*;
- Avaliar a atividade enzimática da tripanotona redutase de promastigotas de *L. braziliensis* tratados com EGCG;
- Mensurar a produção de ERO em promastigotas e amastigotas tratados com EGCG
- Avaliar o $\Delta\psi_m$ de promastigotas de *L. braziliensis* tratados com EGCG;
- Mensurar a produção de ATP de promastigotas tratados com EGCG;
- Estudar a atividade da EGCG em modelo murino de leishmaniose cutânea experimental com *L. braziliensis* e analisar parâmetros bioquímicos.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Fármacos

A epigallocatequina-3-galato (EGCG) foi adquirida comercialmente (Sigma Aldrich, St Louis, EUA) e foi utilizada nos ensaios *in vitro* e *in vivo*. Antimoniato de meglumina (Glucantime, Sanofi-Aventis, São Paulo, Brasil) utilizado como fármaco de referência no experimento *in vivo* (via sistêmica), foi gentilmente cedido pela Farmácia do Instituto de Pesquisas Evandro Chagas (IPEC/FIOCRUZ).

3.2 Parasitos

Amastigotas de *Leishmania braziliensis* (MCAN/BR/98/R619) foram isoladas de hamsters infectados e mantidas como promastigotas a 26°C em meio Schneider (Sigma Aldrich), suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB), 100U/mL de penicilina, 100µg/mL de estreptomicina e 2% de urina. Para a manutenção dos parasitos, foram feitas passagens duas vezes por semana e mantidos sucessivamente até, no máximo, a décima passagem.

3.3 Animais

Para a realização dos ensaios *in vitro* e *in vivo* foram utilizados camundongos *Mus musculus* (Suíço webster e BALB/c, respectivamente) fornecidos pelo Centro de Criação de Animais de Laboratório da FIOCRUZ (CECAL/FIOCRUZ-RJ). Todos os protocolos usados neste trabalho foram aprovados pelo Comitê de Ética da Fundação Oswaldo Cruz (LW-07/10).

3.4 Ensaios *in vitro*

A atividade *in vitro* da EGCG foi avaliada em ambas as formas de *L. braziliensis*, incubando-as em diferentes concentrações do composto, por diferentes períodos de tempo.

3.4.1 Atividade antipromastigota

O efeito da EGCG em promastigotas de *L. braziliensis* foi avaliado pela incubação de 1×10^6 parasitos/mL com concentrações crescentes do composto (62,5 μ M; 125 μ M; 250 μ M e 500 μ M) no tempo de 72 horas a 26°C. O número de células viáveis foi estimado a partir da contagem direta em câmara de Neubauer. O cálculo do IC₅₀ foi estimado por análise de regressão logarítmica no programa *GraphPad Prism 5.0*.

3.4.2 Atividade antiamastigota

Para avaliar a atividade da EGCG sobre amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*, camundongos Suíços foram submetidos à lavagem da cavidade peritoneal com meio RPMI gelado (Sigma Aldrich) suplementado com 10% SFB, 100U/mL de penicilina, 100 μ g/mL de estreptomicina. Posteriormente, 400 μ L de 2×10^6 células totais/mL foram plaqueados em lâminas LAB-TEK (Nunc, Nova Iorque, EUA) e incubadas por 1 hora a 37°C e 5% CO₂ para a adesão. Em seguida, as lâminas foram lavadas com RPMI a 37°C para a remoção das células não aderentes; as que aderiram, principalmente macrófagos, foram infectados com promastigotas de *L. braziliensis* na proporção de 3:1 (3 promastigotas para 1 macrófago), e incubadas por 3 horas a 37°C e 5% CO₂. Após a infecção, as lâminas foram lavadas com meio RPMI a 37°C para a retirada dos parasitos livres e, em seguida, incubadas por 24 horas e 72 horas a 37°C e 5% CO₂ juntamente com concentrações crescentes de EGCG (3 μ M, 6 μ M e 12 μ M). Passado o período de incubação, as lâminas foram submetidas à coloração pelo corante hematológico Instant Prov (Newprov, Curitiba, Brasil) e a atividade antiamastigota foi avaliada microscopicamente contando, pelo menos, 200 macrófagos por amostra. O resultado foi expresso pelo índice de infecção (IF), obtido pela seguinte fórmula:

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

O cálculo do IC₅₀ foi estimado por análise de regressão logarítmica no programa *GraphPad Prism 5.0*.

3.5 Viabilidade dos macrófagos com EGCG

A citotoxicidade da EGCG foi avaliada em macrófagos peritoneais murinos de camundongos Suíços pelo método colorimétrico AlamarBlue® (Invitrogen, Eugene, EUA). Esse ensaio é baseado na conversão da rezasurina em resorufina pelas células viáveis. A rezasurina é um composto não tóxico que é reduzido no interior de células metabolicamente ativas para um produto que apresenta cor, a resorufina. Essa conversão é proporcional ao número de células viáveis, gerando assim uma medida quantitativa da viabilidade celular. Sendo assim, macrófagos peritoneais foram obtidos como descrito anteriormente e plaqueados (2×10^6 macrófagos/mL) e incubados em triplicata com concentrações crescentes de EGCG ($3 \mu\text{M}$ – $3000 \mu\text{M}$) por 24 horas e 72 horas em placa de 96 poços. Após esse período de tempo, foi adicionado em cada poço 20% v/v do reagente AlamarBlue®. A placa foi incubada por 12 horas em estufa a 37°C e 5% CO_2 e a viabilidade foi mensurada colorimetricamente em espectrofotômetro com um comprimento de onda de 560nm. O cálculo do IC_{50} foi estimado por análise de regressão logarítmica no programa *GraphPad Prism 5.0*.

3.6 Dosagem da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2)

A dosagem intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) das células tratadas, ou não, com EGCG foi mensurada conforme descrito por Fonseca-Silva e colaboradores (2011) e Menna-Barreto e colaboradores (2009), respectivamente. Ambos os testes foram avaliados por fluorimetria (Spectra Max GENINI XPS – Molecular Devices, Silicon Valley, EUA).

3.6.1 Produção de ERO

Após a incubação na presença ou ausência de EGCG, promastigotas de *L. braziliensis* foram centrifugadas, ressuspensas em tampão salino HBSS (*Hank's Balanced Salt Solution*) e ajustadas para a concentração de 1×10^7 promastigotas/mL. As células foram distribuídas em triplicatas em placa negra de 96 poços juntamente com $20 \mu\text{M}$ de H_2DCFDA (diacetato de diclorodihidrofluoresceína)

(Invitrogen, Eugene, EUA) – indicador utilizado para mensurar a produção de ERO intracelular – e incubadas no escuro a 26°C por 20 minutos. Em seguida, a análise foi realizada por espectrofluorimetria com comprimento de onda de excitação de 507nm e emissão de 530nm. O controle positivo foi obtido pela reação de 20U/mL de glicose oxidase + 60mM de glicose por 20 minutos.

A formação de ERO também foi mensurada em amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*. Os macrófagos foram obtidos e infectados como descrito no item 3.4.2, com a exceção de que a cultura foi realizada em triplicata em placa negra de 96 poços. Após o período de 24 horas de incubação com a EGCG, a cultura foi lavada com HBSS e incubada com 20 µM de H₂DCFDA por 40 minutos a 37°C e 5% CO₂. Logo após, a análise foi realizada em espectrofluorímetro com os comprimentos de onda supracitados.

3.6.2 Produção de H₂O₂

A produção de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por *L. braziliensis* tratados com concentrações crescentes de EGCG foi avaliada pela utilização do *Amplex Red* (10-acetil-3,7-diidroxifenoxazina) e peroxidase (Invitrogen, Eugene, EUA) conforme adaptado de Menna-Barreto e colaboradores (Menna-Barreto e cols, 2009). Promastigotas de *L. braziliensis* foram cultivados durante 72 horas na ausência ou presença de concentrações crescentes de EGCG (62,5µM, 125µM, 250µM e 500µM). Após esse período de tempo, as culturas foram lavadas com HBSS e ajustadas a 2x10⁷ promastigotas/mL em solução de lise (0,5M de fosfato de potássio; 0,25M de cloreto de sódio; 25mM de ácido fólico, 0,5% de Triton X-100 e 64µM de digitonina (Sigma Aldrich)) juntamente com reagente de trabalho (10mM de reagente *Amplex Red*, 10U/mL de peroxidase em HBSS) por 30 minutos no escuro. A leitura foi realizada em espectrofotômetro no comprimento de onda de excitação de 560nm e emissão 590nm. O controle positivo foi obtido pela reação de 20U/mL de glicose oxidase + 60mM de glicose por 20 minutos.

3.7 Atividade de catalase e PEG-catalase sobre o efeito da EGCG

Para avaliar o efeito da incubação de catalase e PEG-catalase em *L. braziliensis* tratadas com 500 μ M de EGCG, promastigotas (1×10^6 /mL) foram incubados com EGCG juntamente com 500U/mL de catalase (Sigma Aldrich) ou 500U/mL de catalase-poli(etileno)glicol (PEG-catalase) (Sigma Aldrich). Após 72 horas, os parasitos foram contados em câmara de Neubauer para avaliar a atividade da EGCG na presença dessas enzimas e realizada a dosagem de H₂O₂ conforme descrito no item 3.6.2.

A formação de ERO também foi avaliada em amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*. Macrófagos peritoneais de camundongos Suíços foram infectados com *L. braziliensis* e tratados, ou não, com 12 μ M de EGCG na presença ou ausência de 500U/mL de catalase ou 500U/mL de PEG-catalase por 24 horas em placa negra de 96 poços para a realização da mensuração de ERO e em LabTek para avaliar o efeito no índice de infecção. Após esse período de tempo, foi realizada a lavagem dos poços com HBSS a 37°C e adicionada uma solução com 20 μ M de H₂DCFDA, incubado por 30 minutos no escuro à 37°C e 5% CO₂ e realizada a leitura por espectrofluorimetria com comprimento de onda de excitação de 507nm e emissão 530nm. O índice de infecção foi avaliado microscopicamente contando, pelo menos, 200 macrófagos por amostra.

3.8 Atividade da tripanotona redutase (TR)

A atividade da tripanotona redutase (TR) foi avaliada pelo método de Ellman, que se baseia na redução do DTNB (ácido 5,5'-ditio-bis-(2-nitrobenzóico)) a 2TNB⁻ (2-nitro-5-ácido tiobenzóico) pela tripanotona reduzida [T(SH)₂], levando a tripanotona oxidada [T(S)₂] que será regenerada para a T(SH)₂ pela TR. Promastigotas de *L. braziliensis* foram incubadas na ausência ou presença de 500 μ M de EGCG por 72 horas. Após esse tempo, as células foram lisadas e centrifugadas a 12.500g/15 minutos. O sobrenadante foi considerado o extrato solúvel que continha a tripanotona redutase. A concentração de proteína do extrato solúvel foi quantificada usando o espectrofotômetro NanoDrop 1000 (Thermo Scientific). O meio de reação para a dosagem da atividade da tripanotona

redutase era composto por: Tampão Tris-Hepes 40 mM pH 7,5; EDTA 1 mM; NADPH 0,1 mM; Tripanotona oxidada (T[S]₂) 0,05 mM e DTNB 0,1 mM. A reação foi iniciada com a adição de 1mg/mL de extrato de proteína solúvel e incubado por 30 minutos. Após esse período, a atividade da TR (formação do 2TNB⁻) foi avaliada colorimetricamente com comprimento de onda de 410nm.

3.9 Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

O potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de promastigotas de *L. braziliensis* tratadas com diferentes concentrações de EGCG (62,5 μ M, 125 μ M, 250 μ M e 500 μ M) foi avaliado por citometria de fluxo utilizando rodamina 123 e espectrofluorimetria utilizando JC-1.

3.9.1 Ensaio por citometria de fluxo utilizando Rodamina 123

A funcionalidade mitocondrial das promastigotas foi avaliada por citometria de fluxo utilizando-se a sonda fluorescente rodamina 123 (Sigma Aldrich, St Louis, EUA). Os parasitos foram cultivados por 72 horas na presença ou ausência de diferentes concentrações de EGCG. As células foram lavadas, ressuspensas e ajustadas para 1x10⁷ promastigotas/mL em tampão HBSS e incubadas com 10 μ g/mL de rodamina 123 por 30 minutos no escuro a 26°C. Os dados foram adquiridos utilizando-se o canal FL-1 (sensível a detecções na faixa de 515 a 530nm) do citômetro de fluxo FACSCalibur a partir de um total de 10.000 eventos obtidos de regiões previamente definidas para a análise e avaliados pelo programa de computador *Summit v4.3*.

Alterações na intensidade de fluorescência da rodamina 123 foram quantificadas a partir do Índice de Variação (IV) obtido pela equação:

$$IV = (M_T - M_C) / M_C$$

Onde: M_T = mediana de fluorescência para parasitos tratados, M_C = mediana de fluorescência para parasitos controle. Quanto mais negativo o valor do IV, maior o dano mitocondrial gerado (Menna-Barreto e cols, 2009).

3.9.2 Ensaio por espectrofluorimetria usando JC-1

A atividade mitocondrial também foi avaliada pela utilização do JC-1 (iodeto de 5,5', 6,6'-tetracloro-1,1',3,3'-tetraetilbenzimidazolocarbocianina) (Sigma Aldrich), um marcador específico para mensurar o $\Delta\Psi_m$. Após a incubação por 72 horas das promastigotas com diferentes concentrações de EGCG, as células foram lavadas, ressuspensas e ajustadas para 1×10^7 promastigotas/mL em tampão HBSS e incubadas com 10 $\mu\text{g/mL}$ de JC-1 por 10 minutos no escuro a 26°C. Em seguida, as células foram centrifugadas a 3000g por 15 minutos, ressuspensas em 1 mL de HBSS e distribuídas em placa negra de 96 poços. Os valores do potencial mitocondrial foram obtidos por espectrofluorimetria nos seguintes comprimentos de onda: 480 e 530/590 excitação e emissão, respectivamente. Os valores foram obtidos pela razão da emissão entre a fluorescência vermelho/verde (590/530).

3.10 Determinação dos níveis de ATP intracelular

A concentração intracelular de ATP em promastigotas de *L. braziliensis* foi avaliada conforme o protocolo do ensaio luminescente *CellTiter-Glo* (Promega, Wisconsin, EUA). Esse reagente utiliza a luciferase para quantificar o ATP. A luciferase presente no reagente usa a luciferina e o ATP das células, como substrato de uma reação que produz a oxiluciferina, liberando energia em forma de luz que é captada pelo luminômetro. A intensidade do sinal luminescente dessa reação é proporcional à concentração de ATP. As células foram tratadas em concentrações crescentes de EGCG por 72 horas e, após esse período, lavadas em PBS e ajustadas para a concentração de 1×10^7 promastigotas/200 μL . Em seguida, 50 μL da amostra foi transferida para uma placa de 96 poços, homogeneizada com o mesmo volume do reagente *CellTiter-Glo* e incubada no escuro por 10 minutos. A bioluminescência foi mensurada com a utilização do luminômetro GloMax®-Multi Microplate Multimode Reader (Promega).

3.11 Ensaio *in vivo*

O ensaio *in vivo* foi realizado de acordo com o modelo estabelecido por de Moura e colaboradores (2005). Camundongos BALB/c (5 animais por grupo) foram

infectados via subcutânea com promastigotas de *L. braziliensis* (2×10^6 parasitos/10 μ L) na orelha direita. Após 21 dias de infecção, os animais foram submetidos a tratamento diário por mais 11 dias. O tratamento consistiu na administração de 100mg/kg/dia de EGCG por via oral através de sonda orogástrica ou injeção intraperitoneal no quadrante inferior direito do abdômen de 100mg Sb⁵⁺/kg/dia de antimoniato de meglumina (fármaco de referência para o tratamento da leishmaniose). O curso da doença foi acompanhado pela medida da espessura da orelha infectada através do auxílio do paquímetro (Mitutoyo, São Paulo, Brasil), realizada duas vezes por semana. Ao término do experimento (32° dia), os animais foram eutanasiados de acordo com o Manual de Utilização de Animais/FIOCRUZ. A orelha contendo a lesão foi retirada para análise da carga parasitária pelo método de diluição limitante (LDA), isto é, o tecido foi pesado e macerado em meio Schneider suplementado com 20% SFB e 200U/mL de penicilina, 200 μ g/mL de estreptomicina. As células em suspensão foram ajustadas para a concentração de 10mg de tecido/mL e foram diluídas em série de 1:2 em placa de 96 poços, resultando um volume final de 200 μ L por poço. As culturas foram incubadas a 26°C e acompanhadas durante 7 dias em microscópio óptico, para registro da última diluição que continha promastigotas para estimar a carga parasitária proveniente dos 10mg/mL de tecido e expressa em parasitos/mg de tecido.

3.11.1 Avaliação de parâmetros toxicológicos

A coleta de sangue dos animais foi realizada de acordo com o Manual de Utilização de Animais/FIOCRUZ. As amostras foram incubadas em banho-maria a 37°C por 30 minutos para a formação do coágulo e foram centrifugadas a 3000g por 10 minutos. O soro obtido foi utilizado para análise de alguns parâmetros séricos conforme indicado pelo fabricante dos Kits comerciais: dosagem da alamina aminotransferase (ALT ou TGP), aspartato aminotransferase (AST ou TGO) para verificar função hepática (Gold Analisa, Minas Gerais, Brasil) e creatinina para verificar função renal (Doles, Goiânia, Brasil).

3.12 Análise estatística

Os estudos estatísticos dos dados foram realizados utilizando o teste *t* de Student e o teste de ANOVA pós-teste de Bonferroni usando o programa de computador *Graphpad Prima 5*. Todos os experimentos foram realizados em triplicata. Os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$. Os dados foram expressos em média \pm erro padrão.

4 RESULTADOS

4.1 Ensaios *in vitro*

4.1.1 Atividade antipromastigota

Já foi demonstrada a atividade de flavonóides em diversos microorganismos causadores de doenças, como *Toxoplasma*, *Trypanosoma* e *Leishmania* (Lehane e Saliba, 2008). Dentre os flavonóides, a epigallocatequina-3-galato vem recebendo destaque por apresentar alto potencial terapêutico, inclusive apresentando atividade contra *Trypanosoma cruzi* (Güida e cols, 2007). Portanto, o primeiro passo para avaliar a atividade da epigallocatequina-3-galato (EGCG) em *L. braziliensis* foi determinar o seu efeito na proliferação celular sobre as formas promastigotas de *L. braziliensis*. Para isso, promastigotas foram cultivadas por 72 horas com concentrações crescentes da EGCG (62,5 μ M, 125 μ M, 250 μ M e 500 μ M). EGCG inibiu a proliferação celular de maneira dose-dependente (Figura 14), apresentando, uma inibição de 80,7% do crescimento do parasito com IC₅₀ de 278,5 μ M.

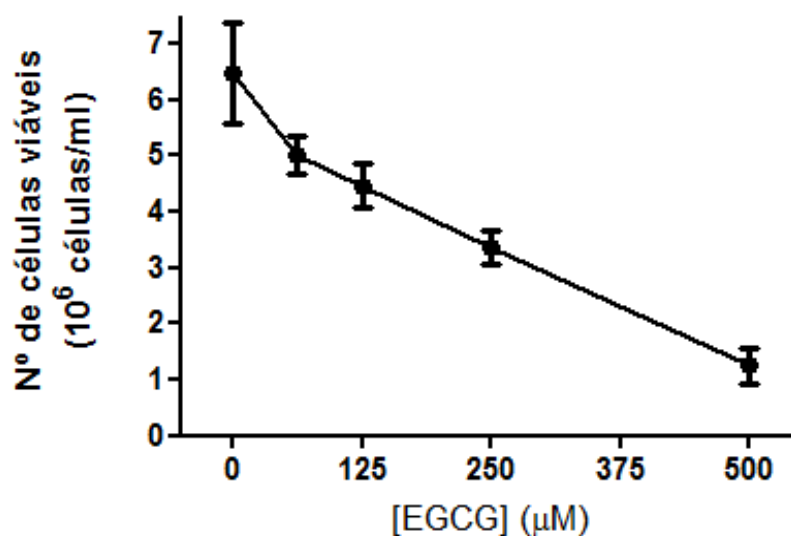


Figura 14 - Atividade antipromastigota da EGCG. Promastigotas de *L. braziliensis* foram incubadas por 72 horas na ausência ou na presença de concentrações crescentes de EGCG. O número de parasitos foi determinado pela contagem direta em câmara de Neubauer, conforme descrito no item 3.4.1. Dados expressos em média \pm erro padrão. (n=3). ANOVA <0,0001.

4.2 Dosagem da produção intracelular de espécies reativas de oxigênio (ERO) e peróxido de hidrogênio (H₂O₂)

Tem sido descrito que alguns flavonóides apresentam a capacidade de induzir morte celular pela produção de radicais livres (Fonseca-Silva e cols 2011; Verchooten e cols, 2012) e, em células de câncer, também foi demonstrada a capacidade de a EGCG induzir a formação de ERO (Li e cols, 2009; Satoh e cols 2013). Portanto, após demonstrar o efeito da EGCG em promastigotas, fomos investigar se o mecanismo de ação desse composto seria pela produção de ERO.

4.2.1 Produção de ERO

A geração de ERO foi quantificada utilizando o indicador fluorescente H₂DCFDA. Esta sonda permeável tem sido usada para detectar principalmente os radicais hidroxila e H₂O₂ presentes no interior da célula. O H₂DCFDA entra pela membrana plasmática da célula e reage com esterases que retiram a parte lipofílica do indicador. Uma vez dentro das células, o H₂DCFDA é convertido pelas ERO em DCF, que é altamente fluorescente. Portanto, um aumento na fluorescência indica aumento da geração de ERO. Assim, promastigotas de *L. braziliensis* foram incubados com diferentes concentrações de EGCG por 72 horas. EGCG promoveu um aumento dose-dependente na formação de ERO, chegando a produzir 4,2 vezes mais do que o controle quando tratados com 500µM de EGCG (Figura 15). O controle positivo adotado foi o sistema de oxidação da glicose pela glicose oxidase, que gera a produção de H₂O₂.

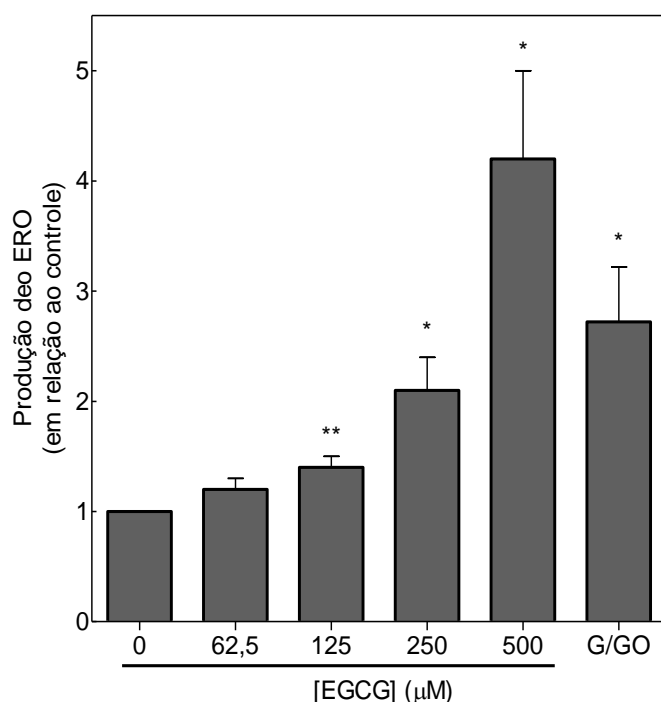


Figura 15 – Formação de ERO intracelular em promastigotas tratadas com EGCG. Promastigotas de *L. braziliensis* foram tratadas, na ausência ou não presença de EGCG por 72 horas. Após, as células foram lavadas e adicionados 20μM de H₂DCFDA por 20 minutos. A fluorescência foi avaliada espectrofluorimetricamente com comprimento de onda de excitação 507nm e emissão 530nm, conforme descrito no item 3.6.1. O controle positivo foi obtido com a adição de 20U/mL de glicose oxidase + 60mM de glicose por 20 minutos. Dados expressos em média ± erro padrão. (n=3). * Diferença significativa em relação ao controle. p<0,05. ** diferença significativa em relação ao controle. p<0,01. O resultado foi expresso em relação à produção do controle.

4.2.2 Produção de H₂O₂

Tem sido descrito na literatura a capacidade que a EGCG possui de induzir a produção de H₂O₂ em células de câncer (Li e cols, 2009) e células beta do pâncreas (Suh e cols, 2010). Portanto, avaliamos se o ERO formado em promastigotas tratados com EGCG seria o H₂O₂. Essa produção foi avaliada com Amplex[®] Red, um marcador que é capaz de reagir especificamente com H₂O₂, gerando um produto fluorescente, resorufina, que quando excitado é capaz de emitir uma fluorescência em um comprimento de onda específico. Portanto, aumento nos níveis de intensidade de fluorescência estaria relacionado com um aumento nos níveis de H₂O₂. Promastigotas incubados com concentrações crescentes de EGCG tiveram uma produção de H₂O₂ de maneira dose-dependente (Figura 16a), produzindo, na concentração de 500μM, um aumento de 2,83 vezes em relação ao controle não

tratado. Essa produção está correlacionada linearmente com a porcentagem de inibição dos promastigotas que receberam o tratamento com EGCG ($R^2=0,975$) (Figura 16b). Dessa forma, podemos sugerir que a inibição dos promastigotas incubadas com EGCG é pela produção de ERO, sendo o principal produto o H_2O_2 .

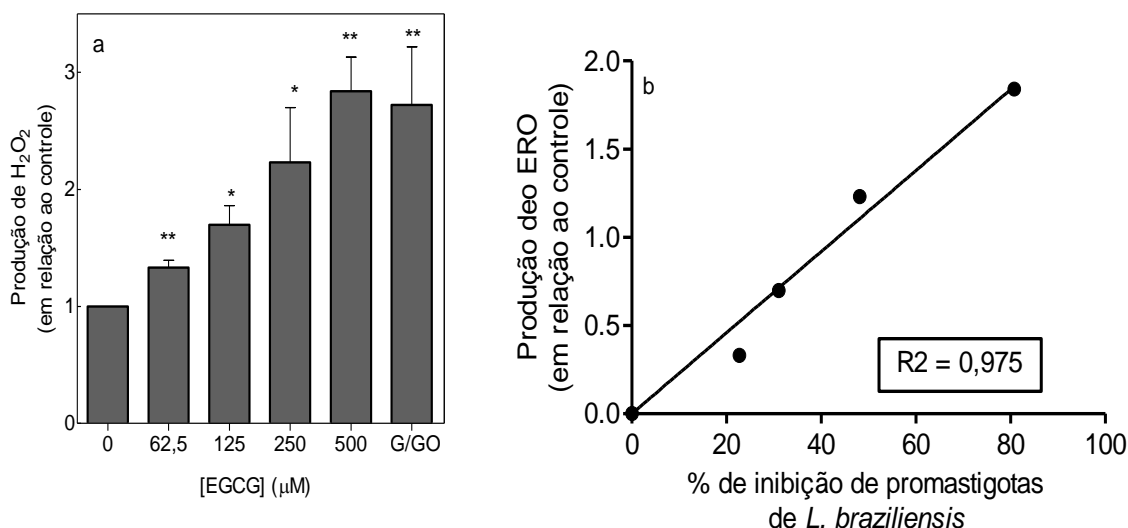


Figura 16 – Produção intracelular de H_2O_2 . (a) Promastigotas de *L. braziliensis* foram incubadas com diferentes concentrações de EGCG por 72 horas. A dosagem foi feita após as células serem lavadas e incubadas com Amplex[®] Red por 30 minutos, conforme descrito no item 3.6.2. A leitura foi realizada em fluorímetro com comprimento de onda de excitação de 560nm e emissão de 590nm. (b) Correlação linear entre a produção de H_2O_2 e a porcentagem de inibição da proliferação de promastigotas tratados com EGCG. Dados expressos em média \pm erro padrão. (n=3). * Diferença significativa em relação ao controle. $p < 0,05$. ** Diferença significativa em relação ao controle. $p < 0,01$. ANOVA $p < 0,01$. $R^2 = 0,975$. O resultado foi expresso em relação à produção do controle.

4.2.3 Efeito da catalase e PEG-catalase em promastigotas tratados com EGCG

Catalase e PEG-catalase (polietilenoglicol-catalase – possui cadeia lipofílica que facilita sua entrada pela membrana plasmática) são enzimas que reagem com H_2O_2 produzindo H_2O e O_2 . Essas enzimas foram utilizadas com intuito de demonstrar que a inibição da proliferação de promastigotas tratadas com EGCG se daria pela produção de H_2O_2 . Promastigotas de *L. braziliensis* foram incubadas na ausência ou presença de 500 μM de EGCG juntamente com as enzimas catalase ou PEG-catalase. EGCG diminui o número de células viáveis, por outro lado, promastigotas incubadas com EGCG e catalase ou PEG-catalase não tiveram diferença significativa em relação ao controle (Figura 17a). Além de inibir a

proliferação celular de promastigotas, a EGCG também foi capaz de aumentar a produção de H_2O_2 . Produção essa que não foi observada nas células incubadas com EGCG e catalase ou PEG-catalase (Figura 17b). Deste modo, a produção de H_2O_2 está diretamente envolvida na inibição da proliferação de promastigotas tratadas com EGCG.

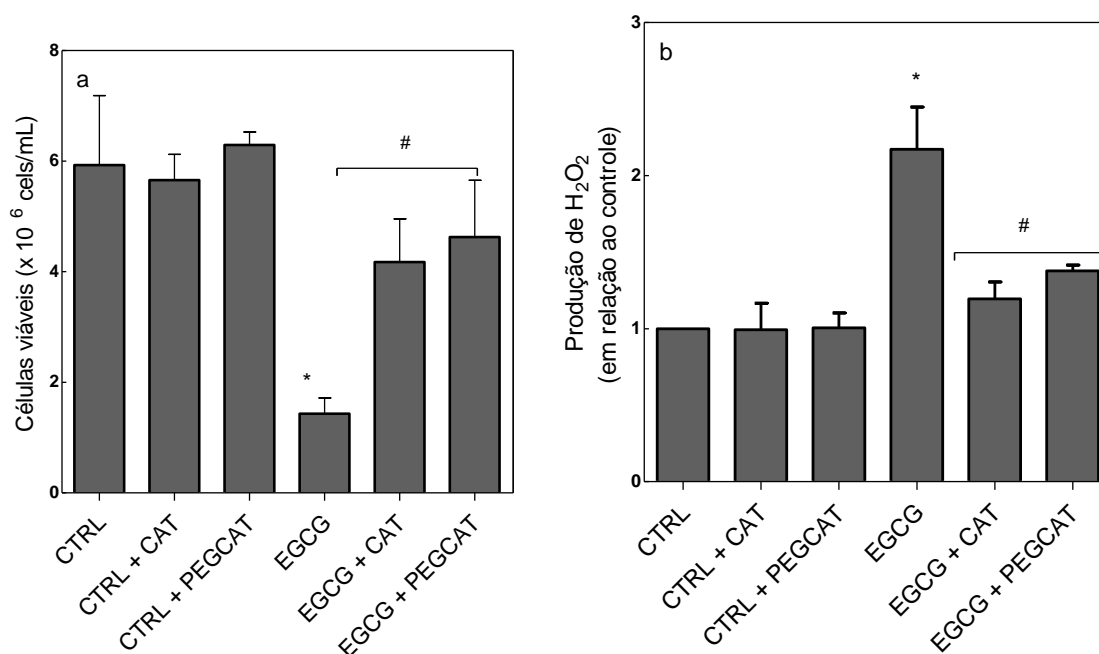


Figura 17 – Efeito da catalase e PEG-catalase sobre o tratamento com a EGCG. Catalase e PEG-catalase foram capazes de proteger o parasito dos danos do estresse oxidativo gerados pela EGCG. (a) Parasitos foram incubados por 72 horas na ausência ou presença de $500\mu M$ de EGCG e catalase ($500U/mL$) ou peg-catalase ($500U/mL$). O número de parasitos foi determinado pela contagem direta em câmara de Neubauer, conforme descrito no item 3.7. (b) Os níveis de H_2O_2 foram avaliados por ,Amplex[®] Red. CTRL = Controle; CAT = catalase; PEGCAT = PEG-catalase. Dados expressos como média \pm erro padrão. (n=3). * Diferença significativa em relação ao controle. $p < 0,05$. # diferença significativa em relação às células tratadas com EGCG. $p < 0,05$. O resultado foi expresso em relação à produção do controle.

4.3 Atividade da Tripanotona redutase (TR)

O mecanismo de manutenção do balanço redox dos tripanosomatídeos difere das células de mamíferos por utilizar a enzima tripanotona redutase (TR) ao invés da glutathiona redutase, o que torna esse sistema um alvo terapêutico seletivo. Já foi demonstrado que um aumento na produção de ERO pode ser gerado pela inibição da TR (Lazarin-Bidóia e cols, 2013; Schirmer e cols, 1987). Com a finalidade de avaliar se a produção de ERO era devido à inibição da TR em *L. braziliensis*,

promastigotas foram incubadas na presença de 500 μ M de EGCG por 72 horas, lisados e centrifugados para obtenção do extrato solúvel e a atividade da TR foi avaliada pela reação de Ellman. EGCG inibiu a atividade da TR em 46% em relação aos promastigotas não tratados (Figura 18).

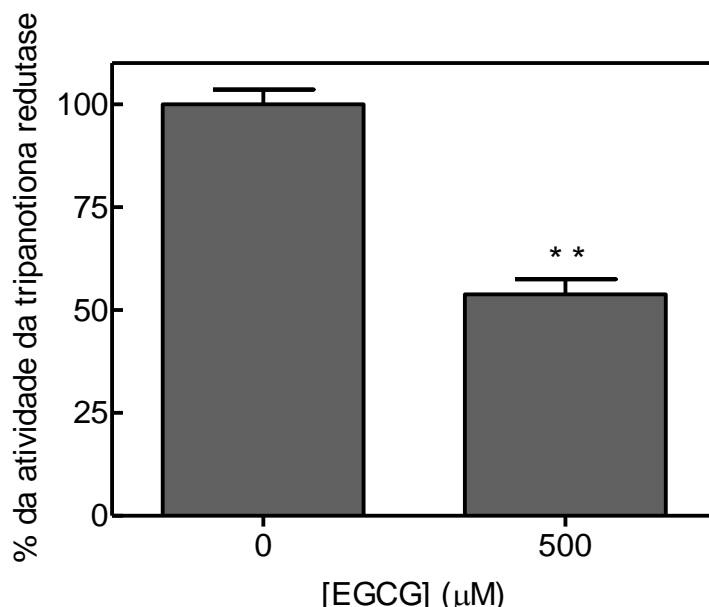


Figura 18 – Efeito da EGCG sobre a atividade da enzima tripanotona redutase. Promastigotas foram incubadas na ausência ou presença de 500 μ M de EGCG por 72 horas, lisados e centrifugados para obtenção do extrato solúvel. A atividade da TR foi avaliada pela reação de Ellman. O equivalente a 1mg/mL do extrato de proteína solúvel foi incubado por 30 minutos com DTNB. Logo após, a atividade da tripanotona redutase foi mensurada espectrofluorimetricamente com o comprimento de onda de 410nm, conforme descrito no item 3.8. ** Diferença significativa em relação ao controle. $p < 0,01$.

4.4 Determinação do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

4.4.1 Ensaio utilizando rodamina 123

O $\Delta\Psi_m$ de promastigotas tratadas com EGCG foi avaliado por citometria de fluxo utilizando a sonda fluorescente rodamina 123, molécula fluorescente catiônica permeável à membrana plasmática e rapidamente seqüestrada por mitocôndrias metabolicamente ativas. Alterações no $\Delta\Psi_m$ desencadeiam um efluxo da rodamina 123 da mitocôndria. Reduções na intensidade total de fluorescência desta sonda, detectadas através do deslocamento dos picos no histograma, apontam para a

perda do $\Delta\Psi_m$. Como controle positivo foi utilizado o FCCP, um conhecido desacoplador da membrana mitocondrial. Após os promastigotas serem submetidos ao tratamento com concentrações crescentes de EGCG por 72 horas, foi observado um deslocamento progressivo na distribuição de células para a esquerda do histograma, o que indica que este composto induziu a despolarização do $\Delta\Psi_m$ dos parasitos (Figura 19). Conforme esperado, essa redução também foi observada em células tratadas com 20 μ M de FCCP, um conhecido desacoplador de membrana mitocondrial. Alterações na intensidade de fluorescência da rodamina 123 foram quantificadas a partir do Índice de variação (IV), obtido pela equação $(MT - MC)/MC$, na qual MT corresponde à mediana de fluorescência para parasitos tratados e MC à mediana de fluorescência para a parasitas controle. Os valores negativos de IV correspondem à despolarização da membrana mitocondrial (Tabela 2).

Tabela 2 – Análise do índice de variação (IV) de promastigotas tratadas com EGCG

[EGCG](μM)	Mediana	Índice de Variação
0	474,16	-
62,5	317,25	-0,33
125	270,01	-0,43
250	225,39	-0,53
500	195,07	-0,59

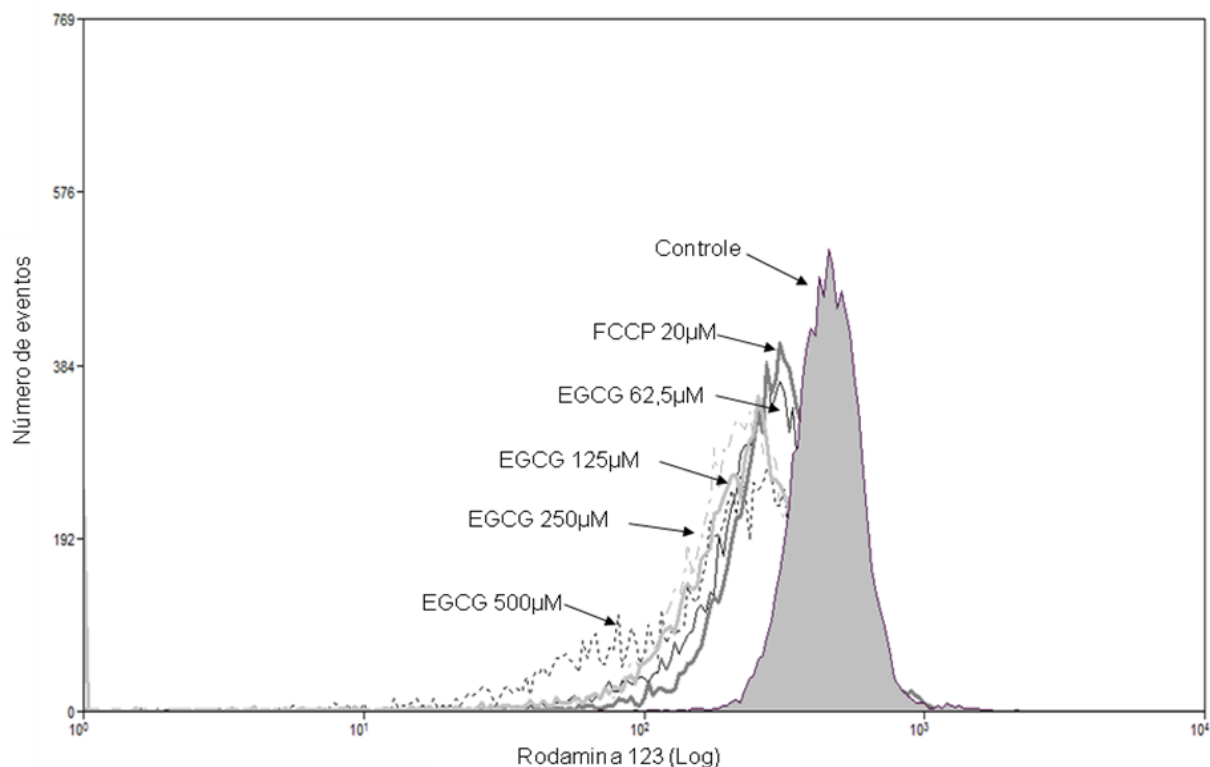


Figura 19 – Determinação do potencial de membrana mitocondrial por citometria de fluxo. Promastigotas de *L. braziliensis* foram incubados com diferentes concentrações de EGCG (62,5µM, 125µM, 250µM e 500µM) por 72 horas, marcados com a sonda fluorescente Rodamina 123 e analisados por citometria de fluxo, conforme descrito no item 3.9.1. O controle positivo foi obtido com a concentração de 20µM de FCCP por 20 minutos. Histograma representativo de um total n=3.

4.4.2 Ensaio utilizando o JC-1

O $\Delta\Psi_m$ também foi avaliado espectrofluorimetricamente utilizando-se a carbocianina catiônica lipofílica JC-1, nos comprimentos de onda 480 e 530/590nm de excitação e emissão, respectivamente. Quando o $\Delta\Psi_m$ está intacto, a diferença de potencial gerada através da membrana mitocondrial interna (negativa do lado interno) leva ao acúmulo de substâncias solúveis em lipídeos dentro da mitocôndria. Dessa forma, em altos $\Delta\Psi_m$, o corante lipofílico JC-1 se acumula e forma agregados no interior da mitocôndria, com mudanças nas suas propriedades fluorescentes. No estado monomérico, o corante fluoresce verde, enquanto no estado agregado o corante fluoresce vermelho. A emissão de fluorescência vermelha derivada da formação de agregados é, portanto indicativa de um alto $\Delta\Psi_m$. Em células com

danos mitocondriais ou alterações no $\Delta\Psi_m$, o corante não se agrega, mantendo sua forma monomérica e acumulando-se no citoplasma emitindo uma fluorescência verde. Assim, a formação e manutenção de agregados no interior da mitocôndria são dependentes do gradiente eletroquímico. A razão entre a fluorescência vermelha/verde (590/530) representa o potencial de membrana mitocondrial. Promastigotas tratadas com diferentes concentrações de EGCG por 72 horas tiveram uma redução dose-dependente do seu $\Delta\Psi_m$ quando comparadas com as células controle (Figura 20). Na concentração de 500 μ M houve uma significativa redução de 68,37% do $\Delta\Psi_m$ em comparação ao controle, deixando claro que EGCG causou danos à mitocôndria do parasito.

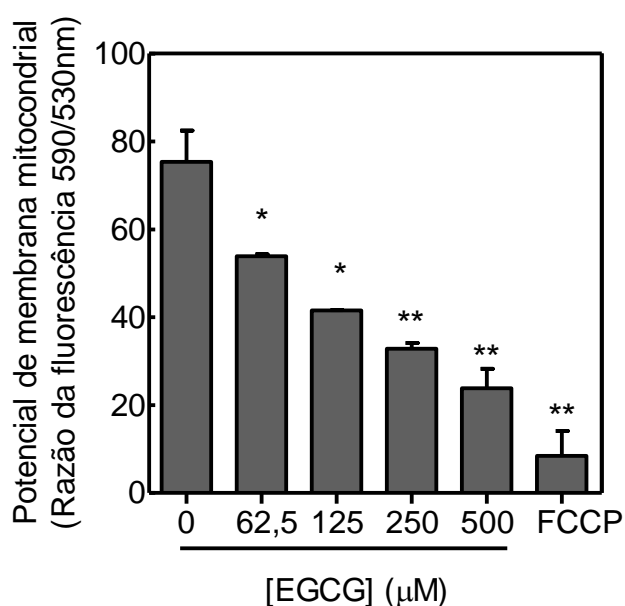


Figura 20 – Determinação do potencial de membrana mitocondrial por espectrofluorimetria. Promastigotas de *L. braziliensis* na ausência ou na presença de concentrações crescentes de EGCG por 72 horas foram incubados com 10 μ g/mL de JC-1. Os resultados foram obtidos fluorimetricamente nos comprimentos de onda de excitação 480nm e emissão 530nm e 590nm, conforme descrito no item 3.9.2. Os dados foram expressos pela razão entre os comprimentos de onda emissão 590nm/530nm. O controle positivo foi realizado com 20 μ M de FCCP. Dados expressos em média \pm erro padrão. (n=3). * Diferença significativa em relação ao controle. p<0,05. ** Diferença significativa em relação ao controle. p<0,01. ANOVA p<0,001.

4.5 Determinação dos níveis de ATP intracelular

Eventos bioquímicos como produção de ERO e diminuição do potencial de membrana mitocondrial podem induzir uma diminuição nos níveis de ATP em *L.*

donovani (Carvalho e cols, 2010) e *L. major* (Dolai e cols, 2011). Portanto, foi avaliado se promastigotas de *L. braziliensis* tratados com EGCG estariam tendo alteração na produção de ATP intracelular. Para isso foi utilizado o reagente *CellTiter-Glo*. Esse reagente utiliza a luciferase para quantificar o ATP. A luciferase presente no reagente usa a luciferina e ATP das células como substrato de uma reação que produz a oxiluciferina, liberando energia em forma de luz que é captada pelo luminômetro. A intensidade do sinal luminescente dessa reação é proporcional à produção de ATP. Sendo assim, promastigotas de *L. braziliensis* foram incubados juntamente com concentrações crescentes de EGCG (62,5µM, 125µM, 250µM e 500µM) por 72 horas e mensurada a produção intracelular de ATP. EGCG diminuiu os níveis de ATP intracelular de maneira dose-dependente, reduzindo sua produção em até aproximadamente 84% no tratamento com 500µM (Figura 21).

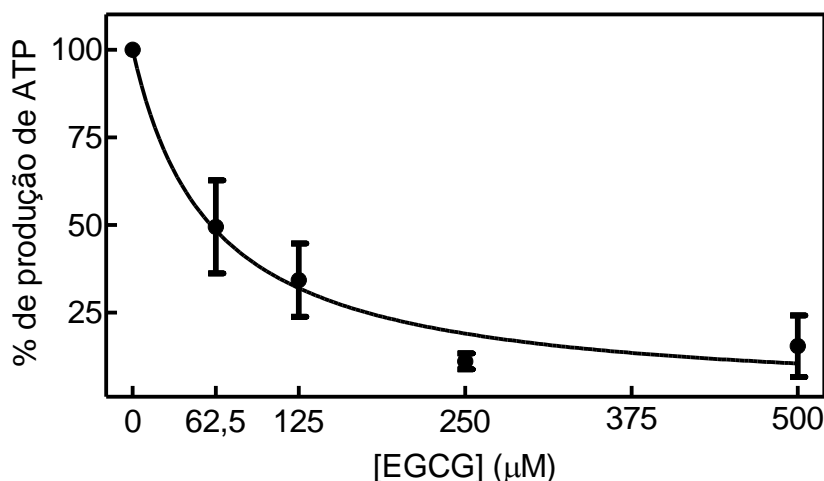


Figura 21 – Determinação dos níveis de ATP intracelular. Promastigotas de *L. braziliensis* foram tratadas com concentrações crescentes de EGCG (62,5µM, 125µM, 250µM e 500µM) por 72 horas. Após as células serem lisadas, foram acrescentados volumes iguais do extrato celular e do reagente *CellTiter-Glo*, conforme descrito no item 3.10. A bioluminescência foi obtida pelo luminômetro. Dados expressos em média ± erro padrão. (n=3). ANOVA<0,0001. 100% = 184,5 nmol ATP x10⁷ células/mL.

4.6 Atividade anti-mastigota

Depois de demonstrar a atividade contra a forma encontrada no inseto vetor, fomos testar na forma intracelular. Para isto, macrófagos peritoneais de camundongos Suíços foram infectados com promastigotas de *L. braziliensis* e

incubados na ausência ou presença de diferentes concentrações de EGCG (3 μ M, 6 μ M e 12 μ M) por 24 horas (Figura 22a) e 72 horas (Figura 22b). EGCG inibiu de maneira dose-dependente o índice de infecção, que correlaciona o percentual de macrófagos infectados com o número de amastigotas, apresentando um IC₅₀ de 3,72 μ M e 3,37 μ M em 24 horas e 72 horas respectivamente. Em 24 horas a inibição do índice de infecção foi de 73% e em 72 horas 94,9% na concentração de 12 μ M. Macrófagos tratados com EGCG não apresentaram diferenças significativas na viabilidade celular (Figura 23a) e função mitocondrial (Figura 23b) nas concentrações utilizadas no tempo de 72 horas. A EGCG apresentou um alto índice de seletividade de 104,68 e 129,38 nos tempos de 24 e 72 horas, respectivamente (Tabela 3).

Tabela 3 – Índice de seletividade

Tempo	IC ₅₀ (μ M) Amastigota	IC ₅₀ (μ M) Macrófago	Índice de seletividade
24 horas	3,72	389,4	104,68
72 horas	3,37	436,3	129,38

Valores de IC₅₀ de amastigota intracelular e macrófagos peritoneais tratados com diferentes concentrações de EGCG por 24 e 72 horas. A partir dos valores de IC₅₀ foi obtido o índice de seletividade pela razão entre o IC₅₀ de macrófagos e o IC₅₀ de amastigota.

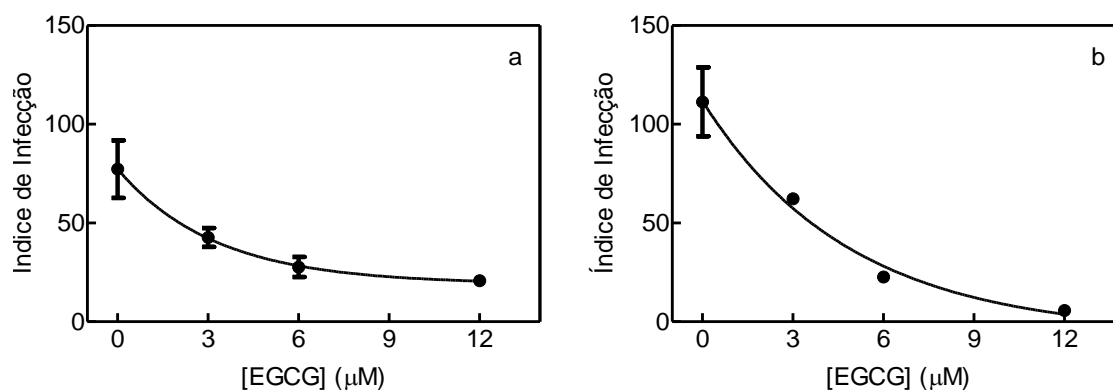


Figura 22 – Atividade antiamastigota da EGCG. Macrófagos murinos foram infectados com promastigotas de *L. braziliensis* e incubados na ausência ou presença de diferentes concentrações de EGCG (3 μ M, 6 μ M e 12 μ M) por 24 horas (a) e 72 horas (b), conforme descrito no item 3.4.2. O valor de IC₅₀ foi de 2,25 μ M e 3,37 μ M em 24 horas e 72 horas respectivamente. Dados expressos como média \pm erro padrão. (n=3). ANOVA <0,0001.

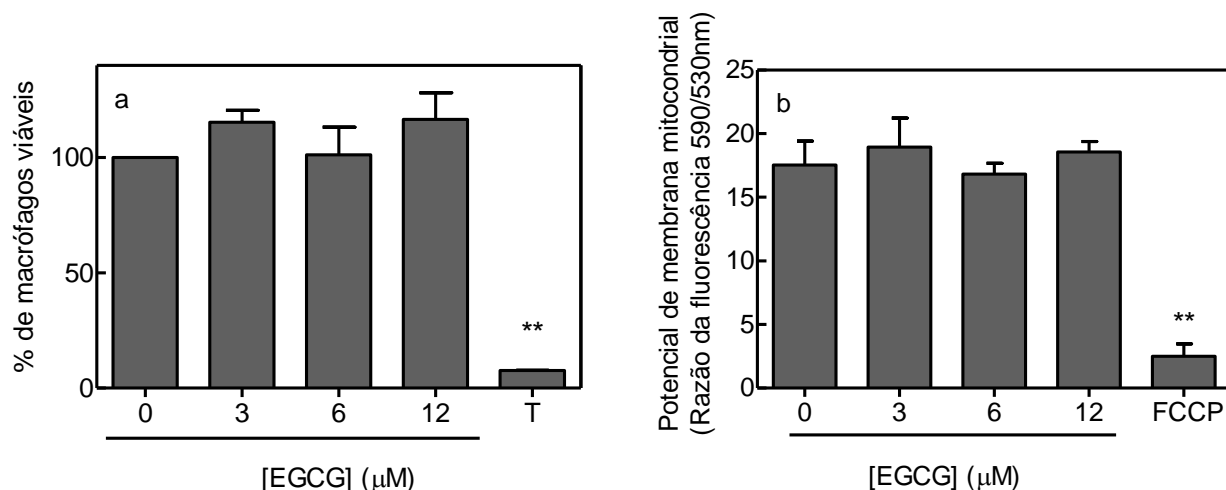


Figura 23 – Efeitos citotóxicos da EGCG em macrófagos murinos. A citotoxicidade da EGCG foi avaliada em macrófagos murinos incubados na ausência ou na presença de concentrações crescentes de EGCG por 72 horas. A viabilidade celular foi avaliada colorimetricamente pelo AlamarBlue® (a) e o potencial de membrana mitocondrial dos macrófagos foi avaliado espectrofluorimetricamente pelo JC-1 (b), conforme descrito no item 3.5. O controle positivo foi realizado com 0,1 % de Triton X-100 (T) (painel A) e 200 μM de FCCP (painel B). Dados expressos como média \pm erro padrão. ($n \leq 3$). ** Diferença significativa em relação ao controle. $p < 0,001$.

4.6.1 Produção de ERO em amastigotas intracelulares tratados com EGCG

Na busca por um mecanismo de ação da EGCG em amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*, macrófagos não infectados e macrófagos infectados com *L. braziliensis* foram incubados na ausência ou na presença de 12 μM de EGCG e 500U/mL de catalase ou 500U/mL de PEG-catalase por 24 horas. EGCG não alterou os níveis de produção de ERO em macrófagos não infectados (Figura 24), bem como não houve diferença significativa na produção de ERO em macrófagos infectados e não tratados em relação ao macrófago não infectado e nem ao macrófago não infectado e tratado (Figura 24). Por outro lado, podemos observar uma produção de ERO em macrófagos infectados e tratados com 12 μM de EGCG, sugerindo que essa produção é proveniente de amastigotas intracelulares (Figura 24).

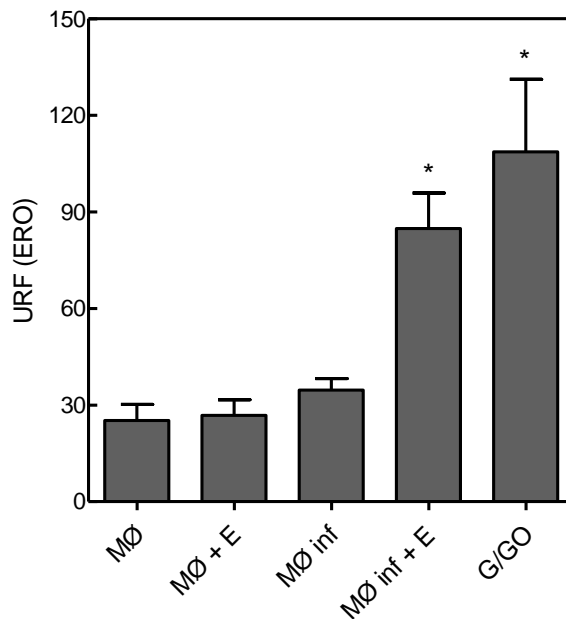


Figura 24 – Produção de ERO em amastigotas intracelulares. Macrófagos peritoneais foram infectados, ou não, com promastigotas de *L. braziliensis* e incubados na ausência ou na presença de 12 μ M de EGCG por 24 horas em placas negras de 96 poços. Após esse tempo, as células foram lavadas e adicionadas 20 μ M de H₂DCFDA por 40 minutos. A análise foi feita por espectrofluorimetria com comprimento de onda de excitação 507nm e emissão 530nm. O controle positivo foi obtido pela adição de 20U/mL de glicose oxidase + 60mM de glicose por 20 minutos. Os dados foram expressos pela Unidade Relativa de Fluorescência (URF). MØ = Macrófago não infectado sem tratamento; MØ + E = Macrófago não infectado tratado com 12 μ M de EGCG; MØ inf = Macrófago infectado não tratado; MØ inf + E = Macrófago infectado e tratado com 12 μ M de EGCG. Dados expressos em média \pm erro padrão. (n=3)* Diferença significativa em relação ao macrófago infectado. p<0,05.

4.6.2 Efeito da catalase e PEG-catalase em macrófagos infectados e tratados com EGCG

Para determinar se a diminuição do índice de infecção em macrófagos infectados e tratados com EGCG é causada pelo aumento nos níveis de ERO, foi elaborado um experimento semelhante ao realizado com promastigotas tratadas com EGCG e 500U/mL de catalase ou 500U/mL de PEG-catalase. Portanto, foram avaliados a produção de ERO e o índice de infecção de macrófagos infectados ou não com *L. braziliensis* e incubados na ausência ou na presença de 12 μ M de EGCG e 500U/mL de catalase ou 500U/mL de PEG-catalase por 24 horas. Inicialmente, demonstramos que catalase e PEG-catalase não alteram o índice de infecção e ao submeter os macrófagos infectados ao tratamento com 12 μ M de EGCG esse índice

sofre uma diminuição significativa de 79,3% (Figura 25a). Os macrófagos infectados e tratados com 12 μ M de EGCG e catalase ou PEG-catalase não apresentaram diferenças significativas em relação aos macrófagos que não foram submetidos ao tratamento com EGCG e teve diferença significativa quando comparados aos macrófagos infectados e tratados com EGCG (Figura 25a). De maneira semelhante em promastigotas, catalase e PEG-catalase foram capazes de proteger a amastigota intracelular do estresse oxidativo gerado pela EGCG. Isso pôde ser observado pelo aumento dos níveis de ERO intracelular nos macrófagos infectados e tratados com EGCG e diminuição desses níveis em macrófagos infectados e tratados com EGCG e catalase ou PEG-catalase (Figura 25b). Fotomicrografias revelaram que macrófagos infectados sem o tratamento com EGCG apresentaram um alto índice de infecção (Figura 25c). Esse índice foi semelhante aos macrófagos infectados e tratados com catalase ou PEG-catalase (Figura 25d, Figura 25e). Porém, ao realizar o tratamento com EGCG, os macrófagos apresentaram uma redução significativa do número de amastigotas, diminuindo severamente o índice de infecção (Figura 25f). Quando realizado o tratamento com EGCG juntamente com catalase ou PEG-catalase, é visto novamente a presença de várias amastigotas no interior do vacúolo parasitóforo (Figura 25g-h). Podemos observar também que as enzimas catalase e PEG-catalase não alteram a viabilidade celular dos macrófagos.

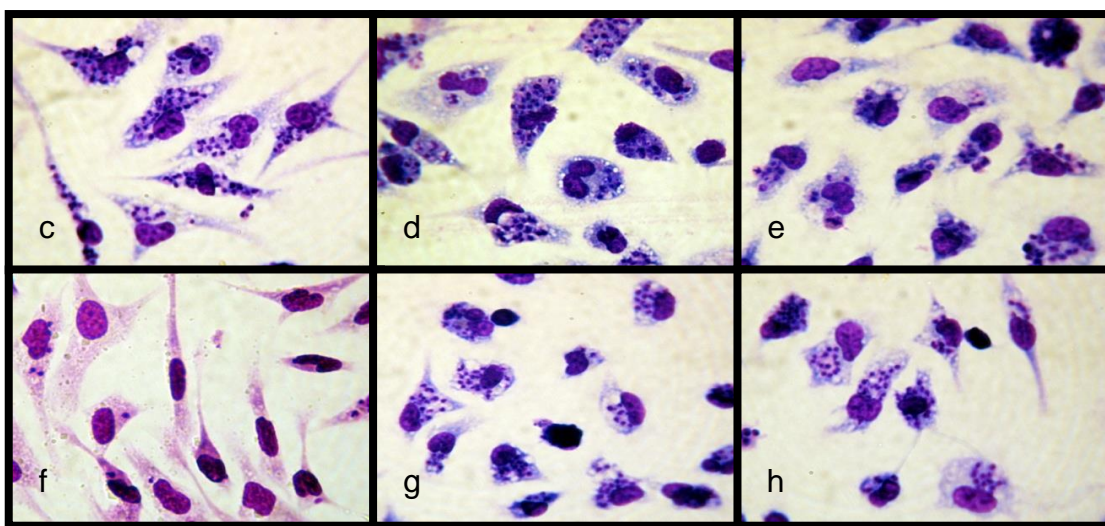
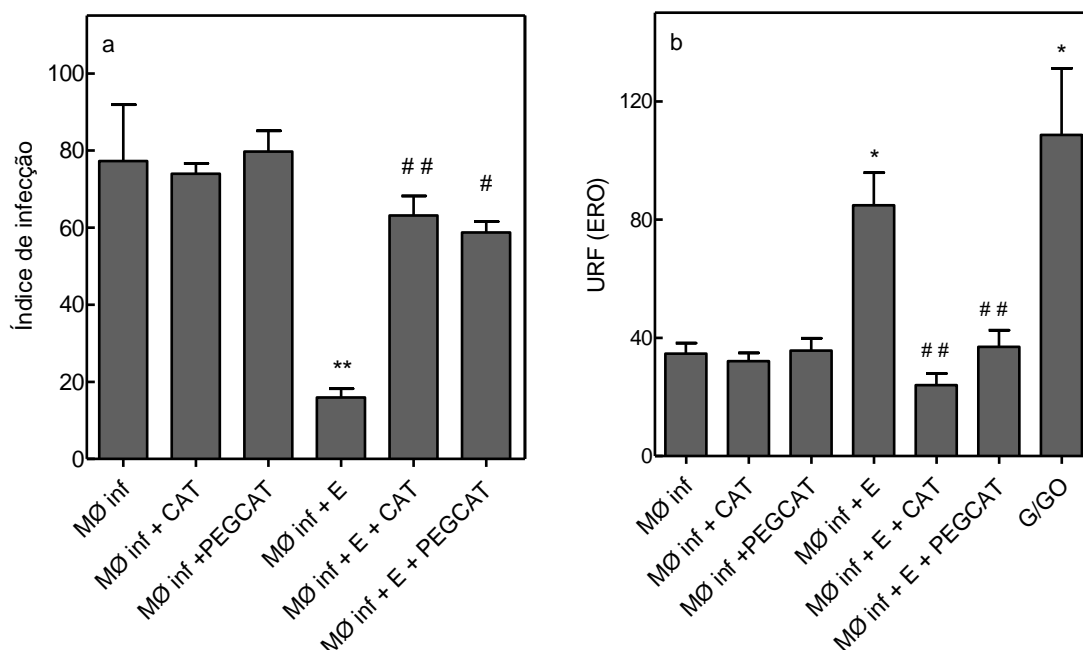


Figura 25 – Avaliação do mecanismo de ação da EGCG em amastigota intracelular. (a) Macrófagos infectados foram incubados por 24 horas na ausência ou presença de 12 μ M de EGCG 500U/mL de catalase ou 500U/mL de PEG-catalase. (b) A produção de ERO foi mensurada com H₂DCFDA e a sua produção foi avaliada fluorimetricamente, conforme descrito no item 3.7. O controle positivo foi obtido com a adição de 20U/mL de glicose oxidase + 60mM de glicose. Os dados foram expressos pela Unidade Relativa de Fluorescência. Fotomicrografia em diferentes situações (aumento de 1000x): (c) MØ inf (d) MØ inf + catalase. (e). MØ inf + PEG-catalase. (f). MØ inf + E. (g) MØ inf.+ E + catalase. (h) MØ inf + E + PEG-catalase. MØ inf = Macrófago infectado não tratado; MØ inf.+ cat = Macrófago infectado tratado com catalase; MØ inf + PEG = Macrófago infectado tratado com PEG-catalase; MØ inf + E = Macrófago infectado tratado com EGCG; MØ inf.+ E + CAT = Macrófago infectado tratado com EGCG e catalase; MØ inf + E + PEG = Macrófago infectado tratado com EGCG e PEG-catalase. Fotomicrografia representativo de um total de n=3. Dados expressos em média \pm erro padrão. (n=3). * Diferença significativa em relação ao MØ inf. p<0,05. ** Diferença significativa em relação ao MØ inf. p<0,01. # Diferença

significativa em relação ao MØ inf + E. $p < 0,05$. ## Diferença significativa em relação ao MØ inf + E. $p < 0,01$.

4.7 Atividade *in vivo*

Considerando os resultados obtidos *in vitro*, foram realizados testes para avaliar a atividade da EGCG em modelo murino de leishmaniose cutânea. Para isso, promastigotas de *L. braziliensis* foram inoculadas na orelha direta de camundongos BALB/c e após 21 dias foi iniciado o tratamento diário durante 11 dias pela administração por via oral com 100mg/kg/dia de EGCG ou por via intraperitoneal com 100mg Sb⁵⁺/kg/dia de antimoniato de meglumina. EGCG mostrou-se eficiente logo após o início do tratamento, controlando a progressão doença até o final do experimento, apresentando diferenças significativas no tamanho da lesão em relação ao grupo controle e demonstrando um perfil semelhante ao antimoniato de meglumina (fármaco de referência para o tratamento da leishmaniose) (Figura 26a), além de promover uma redução significativa da carga parasitária (Figura 26b). Fotografias tiradas no 32° dia de infecção revelaram diferenças clínicas entre as orelhas dos camundongos que não receberam tratamento e os que receberam tratamento com EGCG por via oral e antimoniato de meglumina por via intraperitoneal (Figura 26c-e). Testes bioquímicos realizados mostraram que o tratamento via oral de EGCG não promoveu alterações renais ou hepáticas. Os níveis de creatinina (avaliação da função renal) foram semelhantes ao controle tratado com PBS (veículo da EGCG) (Figura 27a), assim como os níveis de ALT e AST (avaliação da função hepática), que também foram semelhantes ao controle (Figura 27b-c).

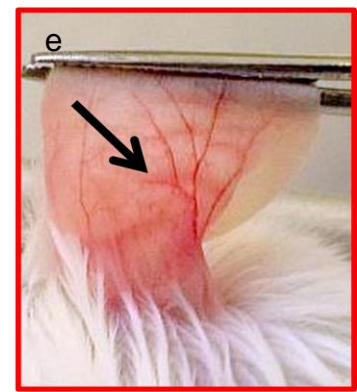
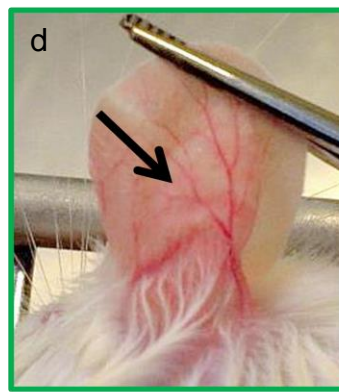
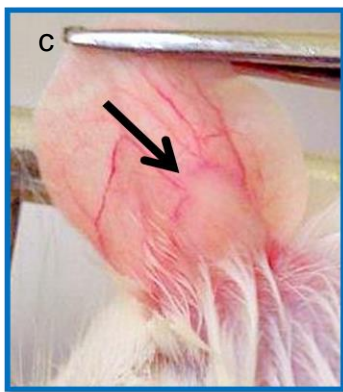
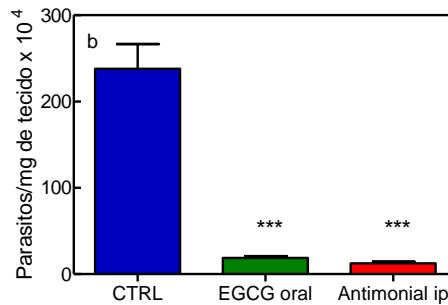
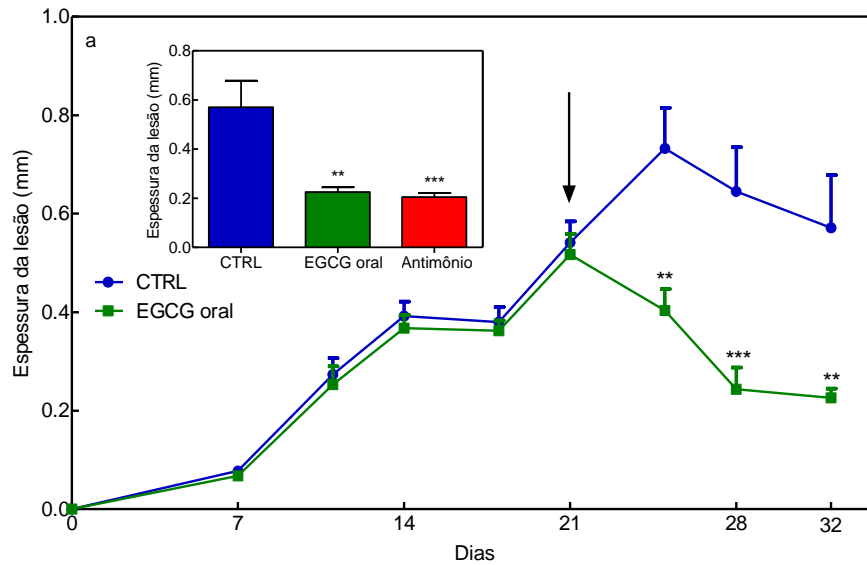


Figura 26 – Atividade *in vivo* da EGCG. (a) Camundongos BALB/c foram infectados na orelha com promastigotas de *L. braziliensis* e após 21 dias de infecção foi dado início ao tratamento (indicado pela seta) que foi realizado com 100mg/kg/dia de EGCG por via oral ou 100mg Sb⁵⁺/kg/dia de antimônio de meglumina via intraperitoneal por 11 dias contínuos. (Insero). Tamanho da lesão dos grupos no dia 32. (b) Após 32 dias de infecção os animais foram eutanasiados e a carga parasitária foi obtida por LDA, conforme descrito no item 3.11. Foto representativa da orelha no 32º dia de infecção do grupo controle (c); EGCG oral (d) e Antimônio ip (e) em destaque diferença do tamanho da lesão. Dados expressos em média \pm erro padrão. (n=10). ** Diferença significativa em relação ao controle. $p < 0,001$. *** Diferença significativa em relação ao controle. $p < 0,0001$.

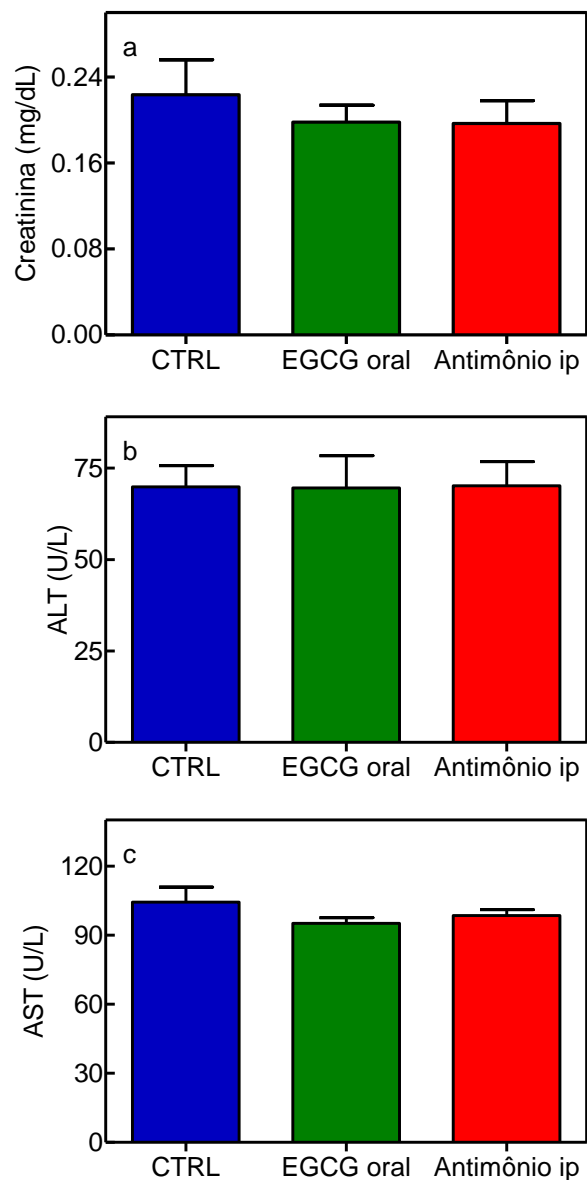


Figura 27 – Avaliação toxicológica. O soro obtido através da coagulação e centrifugação do sangue coletado dos animais foi submetido à análise de padrões toxicológicos. Para a avaliação da função renal foi utilizado creatinina (a) (Valores de referência: 0,2-0,8 mg/dL); para toxicidade hepática, foram utilizados a alanino aminotransferase (ALT) (b) (Valores de referência: 28-132 U/L) e aspartato aminotransferase (AST) (Valores de referência: 59-247 U/L)(c), conforme descrito no item 3.11.1. Dados expressos em média \pm erro padrão. (n=10).

5 DISCUSSÃO

As leishmanioses ainda hoje são classificadas como Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) As DTNs são definidas como doenças mortais ou muito graves, cujas opções de tratamentos são inadequadas ou não existem, e o seu mercado é insuficiente para provocar uma pronta resposta do setor privado (Remme e cols, 2002; MSF, 2001). Um levantamento feito entre 1975 e 2004 revelou que dos 1556 medicamentos lançados no mercado apenas 21 são destinados a pacientes com DTNs, ou seja, um investimento inferior a 2% (DNDi, 2012; Lindoso e Lindoso, 2009).

O primeiro tratamento eficaz contra leishmaniose foi instituído pelo médico brasileiro Gaspar Vianna (Vianna, 1912) e, desde então, os antimoniais sofreram algumas modificações e até hoje são utilizados na clínica como primeira opção de tratamento na maioria dos países. Outros fármacos também foram desenvolvidos contra a leishmaniose, porém todos apresentam severos efeitos colaterais, altos custos, além de dificuldades no tratamento por serem administrados por via intramuscular ou endovenosa e apresentarem vários relatos de resistência e falha no tratamento (Gasser e cols, 1994; Sundar e cols 1998). Nesse contexto, faz-se necessária a busca de novos fármacos e alvos terapêuticos que possibilitem o desenvolvimento de outros compostos que apresentem menor toxicidade, maior eficácia e facilidade de administração.

Hoje, várias substâncias derivadas de plantas são aplicadas no tratamento de diversas doenças e representam uma grande oportunidade para o descobrimento de novos medicamentos (Polonio e Efferth, 2008; Ndjonka, 2013). Dentre os derivados de plantas que vem recebendo grande destaque estão os flavonóides. Estes são metabólitos secundários que pertencem ao grupo dos polifenóis e são sintetizados por plantas, como a *Camelia sinesensis* e *C. recucita*. Devido as suas propriedades farmacológicas, vem recebendo destaque por possuírem atividades antivirais, antiinflamatórias, antineoplásicas, tripanosomicidas e leishmanicidas (Weston e Mathesius, 2013; Aboulaila e cols, 2010; Güida e cols, 2007; Hoensch e Oertel, 2012; Fonseca-Silva e cols, 2011, Inácio e cols, 2012). A epigallocatequina-3-galato (EGCG) é um flavonóide e a principal catequina do chá verde originado da *C.*

sinesensis. Esse composto tem recebido destaque por apresentar potentes efeitos terapêuticos, inclusive em parasitos da família Trypanosomatidae, como por exemplo, *Trypanosoma cruzi* (Güida e cols, 2007). No presente estudo, demonstramos a atividade da EGCG em ambas às formas de *L. braziliensis* bem como o seu mecanismo de ação e o seu efeito *in vivo* em modelo murino de leishmaniose cutânea.

O tratamento com EGCG nas formas promastigotas de *L. braziliensis* inibiu a proliferação celular de maneira dose-dependente no tempo de 72 horas. O composto inibiu 83,9% do crescimento do parasito na concentração de 500µM apresentando um IC₅₀ de 278,5µM (Figura 14). Efeito similar foi demonstrado em *T. cruzi* (Güida e cols, 2007) e *L. amazonensis* (Inácio e cols, 2012).

De modo geral, os flavonoides são conhecidos por apresentarem um alto potencial antioxidante, estando associadas no combate de doenças cardiovasculares e câncer. Essa propriedade está relacionada com a indicação de consumo diário principalmente de frutas e outros vegetais (Havsteen, 2002). Por outro lado já foi demonstrada a produção de ERO em células de câncer tratadas com alguns flavonóides, como a quercetina, apigenina e EGCG (Bishayee e cols, 2013; Das e cols, 2012; Li e cols, 2009), assim como já foi demonstrada a produção de ERO em *L. amazonensis* tratadas com quercetina (Fonseca-Silva e cols, 2011). A EGCG pode apresentar efeito pró-oxidante ou antioxidante. O que determina esse fato é o ambiente e a concentração do composto (Yang e cols, 2004; Zhou e Elias, 2013). A produção de H₂O₂ já foi observada em células beta do pâncreas tratadas com EGCG (Suh e cols, 2010). De maneira semelhante, foi observado que promastigotas de *L. braziliensis* tratadas com concentrações crescentes de EGCG tiveram um aumento dose-dependente da produção de ERO (Figura 15). Dentre as espécies reativas de oxigênio, encontra-se o ânion superóxido, o radical hidroxila e o peróxido de hidrogênio. A EGCG é capaz de gerar seletivamente um aumento significativo na produção de H₂O₂ (Figura 16a) em promastigotas de *L. braziliensis* de maneira dose dependente. Para melhor esclarecer o mecanismo de ação da EGCG, foi avaliada a correlação entre a produção de H₂O₂ e o percentual de inibição dos promastigotas tratadas com EGCG. Este apresentou uma linearidade entre

esses dois eventos, com um $R^2 = 0,975$ (Figura 16b). Ainda para corroborar os resultados, foram utilizadas as enzimas catalase e PEG-catalase para observar se a produção de H_2O_2 estaria sendo responsável pela inibição da proliferação celular dos promastigotas. A catalase é uma enzima que protege as células dos danos oxidativos degradando o peróxido de hidrogênio em água e oxigênio ($2H_2O_2 \rightarrow 2H_2O + O_2$) (Alfonso-Prieto e cols, 2012). Primeiramente, foi demonstrado que os promastigotas incubados somente com catalase ou PEG-catalase não alteraram a sua viabilidade celular nem a produção de H_2O_2 (Figura 17). E, quando submetidos ao tratamento conjunto de EGCG com catalase ou PEG-catalase observou-se que o número de células viáveis foi equiparado ao controle, assim como a produção de H_2O_2 , além de apresentar diferença significativa do número de células viáveis e níveis de H_2O_2 produzidos pelos promastigotas tratadas somente com EGCG (Figura 17). Dessa forma, fica claro que o mecanismo de inibição celular se dá seletivamente pela produção de H_2O_2 . A catalase já foi usada por Suh e colaboradores (2010) para demonstrar uma proteção do efeito inibitório da EGCG em células beta pancreáticas, que está relacionada a produção de H_2O_2 .

A manutenção de um ambiente intracelular adequado, com a redução de dissulfetos e a neutralização de hidroperóxidos, ocorre, na maioria dos sistemas biológicos, por reações eficientes de óxido-redução envolvendo a glutathione e a glutathione redutase. Entretanto, a glutathione redutase não é encontrada em tripanosomatídeos, e o equilíbrio entre as formas glutathione, ocorre através de uma troca não enzimática tiol-dissulfeto com a tripanotiona (Fairlamb, 1989; Krauth-Siegel e cols, 1995). A forma reduzida da tripanotiona $T(SH)_2$ é mantida dentro da célula através da ação específica da tripanotiona redutase (TR). A $T(SH)_2$ é uma molécula chave nos mecanismos de defesa destes parasitos contra os danos oxidativos. O desbalanço redox pode induzir um aumento nos níveis de ERO (Lazarin-Bidóia e cols, 2013; Irigoín e cols, 2008). O tratamento de promastigotas de *L. braziliensis* por 72 horas com $500\mu M$ de EGCG inibiu aproximadamente 46% da atividade da TR (Figura 18). A relação entre a diminuição da atividade da TR com a produção de ERO já foi vista em outros parasitos. Em *T. cruzi*, foi demonstrado que a neoglinana eupomatenóide-5 isolada da planta *Piper regnali* induziu um desbalanço oxidativo

nas três formas evolutivas do parasito, demonstrados pelo aumento nos níveis de ERO e diminuição da atividade da TR (Lazarin-Bidóia e cols, 2013). Portanto, nossos dados sugerem que a EGCG inibe a TR, promovendo um desbalanço redox no parasito e, conseqüentemente, gerando um aumento nos níveis de ERO.

É amplamente descrito que um aumento nos níveis de ERO podem desencadear uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) (Fidalgo e Gille, 2011; Galluzi e cols, 2013). Uma característica geral de todos os tripanosomatídeos é que eles apresentam uma única, isso a torna uma organela atrativa como alvo terapêutico, pois está diretamente envolvida na produção de ATP através da fosforilação oxidativa (Fidalgo e Gille, 2011). Nos metazoários, mitocôndrias viáveis podem compensar o mau funcionamento daquelas que foram danificadas. Entretanto, em *Leishmania*, o processo de sobrevivência está relacionado diretamente com o funcionamento dessa única organela e, em última instância, de sua cadeia respiratória (Shaha, 2006). Foi descrito que EGCG tem efeito direto em promastigotas de *L. amazonensis*, gerando diminuição no $\Delta\Psi_m$ que está relacionada com a inibição dos promastigotas tratados com o composto (Inácio e cols, 2012). Conforme o esperado, EGCG também induziu a perda do $\Delta\Psi_m$ em promastigotas de *L. braziliensis*. Esse evento pôde ser observado tanto por citometria de fluxo, utilizando-se rodamina 123 (Figura 19) como também por espectrofluorimetria, utilizando-se o JC-1 (Figura 20), um corante mais sensível e específico para função mitocondrial (Savioli e cols, 1997). Ambos demonstraram uma diminuição dose-dependente do $\Delta\Psi_m$ das células tratadas com EGCG. O ensaio por citometria de fluxo foi quantificado através do índice de variação, que é obtido pela diferença entre a mediana de fluorescência dos parasitos tratados com a dos parasitos controles dividido pela mediana do controle (Menna-Barreto e cols, 2009). Conforme mostrado na Tabela 3, houve uma diminuição nos valores desse índice, indicando uma despolarização da membrana mitocondrial das promastigotas tratadas com EGCG. Alterações ultraestruturais e colapso do $\Delta\Psi_m$ já foram observados em *L. amazonensis* (Inácio e cols, 2012; Fernanda-Silva e cols, 2011; Khouri e cols, 2010), *L. donovani* (Roy e cols, 2008) e *T. cruzi* (Menna-Barreto e cols 2007, 2009; Santa-Rita e cols, 2006) após o tratamento com diversos compostos.

O potencial de membrana mitocondrial é essencial para a sobrevivência das células. Alterações nesse potencial podem gerar vários eventos, como diminuição da atividade da cadeia transportadora de elétrons, levando a uma diminuição da concentração de ATP intracelular. Durante a fosforilação oxidativa, os elétrons são movidos pela cadeia respiratória mitocondrial e um gradiente de prótons é gerado através da membrana interna da mitocôndria, produzindo ATP (Fidalgo e Gille, 2011). A ausência do potencial de membrana mitocondrial em células tratadas com a naftoquinona LQB-118 induziu uma diminuição nos níveis de ATP em *L. amazonensis* (Ribeiro e cols, 2013). Foi demonstrado que EGCG diminuiu a produção de ATP em promastigotas tratadas com crescentes concentrações do composto por 72 horas, chegando a uma inibição de aproximadamente 84% dessa produção quando tratados com 500 μ M. Esse evento estaria relacionado com a perda do potencial de membrana mitocondrial gerado, pois a célula estaria perdendo prótons do espaço intermembranar mitocondrial. Sem eles, não seria possível gerar ATP pela F₀F₁ ATP sintetase (Roy e cols, 2008).

Após demonstrar a atividade da EGCG contra a forma encontrada no inseto vetor, fomos investigar se o composto também seria eficaz na forma intracelular encontrada no hospedeiro vertebrado. Assim como em promastigotas, a EGCG também mostrou-se eficiente no controle da infecção causada por *L. braziliensis* em macrófagos murinos, tanto no tempo de 24 horas (Figura 22a) e 72 horas (Figura 22b). EGCG não foi tóxica para os macrófagos murinos (Figura 23a), assim como não alterou o potencial mitocondrial dessas células (Figura 23b). A Tabela 2 indica os valores de IC₅₀ dos macrófagos e amastigotas quando submetidas ao tratamento com EGCG por 24 horas e 72 horas. A partir desses dados, foi calculado o índice de seletividade. Segundo Weniger (Weniger e cols, 2001), considera-se que a eficácia biológica não é devido à citotoxicidade *in vitro* quando este índice é ≥ 10 . Nesse caso, EGCG mostrou-se bastante seletiva em induzir danos apenas nas amastigotas intracelulares, apresentando um índice de seletividade de 104,68 e 129,38 em 24 horas e 72 horas, respectivamente.

Com os resultados obtidos nas formas promastigotas em relação ao mecanismo de ação, propomos um mecanismo semelhante para as formas

amastigotas. Na Figura 24 mostramos que a EGCG atua induzindo a produção de ERO de maneira seletiva nas formas amastigotas do parasito. Não foram observadas alterações dessa produção em macrófagos não infectados e tratados com o composto, ao passo que em macrófagos infectados e tratados com 12 μ M de EGCG houve uma produção aproximadamente 3 vezes maior em relação aos macrófagos sem infecção e macrófagos infectados. Para confirmar esses dados, também foram utilizadas as enzimas catalase e PEG-catalase com o objetivo de sugerir que a EGCG estaria diminuindo a infecção de amastigotas por sua atuação no balanço redox do parasito, induzindo a formação de ERO. EGCG atuou seletivamente nos macrófagos infectados que não foram tratados com catalase ou PEG-catalase. Nesses macrófagos, gerou diminuição do índice de infecção e aumento na produção de ERO em 24 horas, mostrando que essa produção é um efeito primário da EGCG no tratamento contra as amastigotas intracelulares. Por outro lado, os macrófagos que foram tratados com EGCG concomitantemente com as enzimas apresentaram maior índice de infecção e menor produção de ERO. Esse evento estaria acontecendo pela ação protetora da catalase e PEG-catalase aos peróxidos de hidrogênio, pois sem as enzimas a EGCG atua diretamente nas amastigotas levando a formação de ERO. Já com as enzimas, ocorre a reação com o peróxido de hidrogênio, protegendo as amastigotas desse estresse oxidativo (Figura 25).

O tratamento para a leishmaniose é, ainda hoje, considerado tóxico e ineficaz, e baseado no sucesso *in vitro* da EGCG em *L. braziliensis* realizamos um ensaio *in vivo* para demonstrar sua eficiência no tratamento da leishmaniose cutânea em modelo murino. A atividade *in vivo* da EGCG já foi demonstrada contra: vírus do papiloma humano (HPV) (He e cols, 2013); câncer de pâncreas (Shankar e cols, 2013); endometriose (Ricci e cols, 2012); doença de Chagas (Güida e cols, 2007).

Os modelos de animais são amplamente utilizados, tanto para estudar o curso da doença, quanto para avaliar a atividade de novas drogas (Hudson e De Vito, 1994), sendo o modelo murino de leishmaniose usado principalmente como ferramenta para elucidar perfis imunológicos da doença, para esclarecer eventos celulares em camundongos geneticamente diferentes e, principalmente, na busca de

novos quimioterápicos. Ainda não existe um modelo murino ideal para a infecção com *L. braziliensis*, uma vez que a maioria dos modelos utilizados para as outras espécies de *Leishmania* se mostra resistentes à infecção com *L. braziliensis*. Esse fenótipo vem sendo associado à incapacidade do parasito em inibir a resposta do tipo Th-1 desenvolvida pelo hospedeiro após a infecção, caracterizada pela produção de altos níveis de IFN- γ e baixa produção de IL-4 e IL-10 (de Moura e cols, 2005). Mesmo assim, o modelo murino experimental de leishmaniose cutânea causado por *L. braziliensis* tem sido estabelecido em camundongos BALB/c. A estratégia para o sucesso desse modelo é baseada na mimetização do curso natural da doença, realizando um inoculo pequeno (10^5 - 10^6) na derme da orelha do camundongo. Nesse modelo, ocorre o aparecimento da lesão que progride de maneira crescente até próximo a quarta semana, mas diminui gradativamente pelo tipo de resposta imunológica do camundongo (de Moura e cols, 2005; Khouri e cols, 2010). Além do efeito *in vitro*, EGCG também mostrou-se eficiente para o controle da doença *in vivo* por via oral. É importante observar que o tratamento foi iniciado após 3 semanas de infecção, pois neste tempo, já podia ser observada uma lesão característica da doença (Miguel e cols, 2009).

Quando a EGCG foi avaliada em modelo murino de doença de Chagas aguda, a concentração utilizada foi de 0,8mg/kg/dia, porém a administração foi realizada por via intraperitoneal (Güida e cols, 2007). Ao ser utilizada a administração por via oral, concentrações mais elevadas foram utilizadas, como é o caso do tratamento para tumor no pâncreas (60-100mg/kg/dia) (Shankar e cols, 2013) e endometriose (20-100mg/kg/dia) (Ricci e cols, 2012). Essa discrepância pode ser explicada pelo efeito de primeira passagem sofrido no fígado, onde aproximadamente 80% é metabolizado nesse órgão (Havsteen, 2002). A concentração utilizada de EGCG para o tratamento da leishmaniose cutânea em camundongos infectados com *L. braziliensis* foi de 100mg/kg/dia. Logo nos primeiros dias após o início do tratamento, EGCG já se mostrou bastante eficiente diminuindo significativamente o tamanho da lesão em apenas 5 dias de administração. Neste período, no grupo controle, que recebeu o veículo (PBS), houve um aumento da lesão atingindo o ápice na espessura da lesão. Após esse pico, a lesão dos animais do grupo controle diminuiu

gradativamente, ao passo que os animais tratados com EGCG tiveram uma redução mais acentuada, apresentando uma diferença significativa do tamanho da lesão em relação aos animais do controle, que se manteve até o final do experimento (32º dia) (Figura 26a). O grupo que foi tratado com antimoniato de meglumina administrado, fármaco de referência para o tratamento da leishmaniose – por via intraperitoneal –, demonstrou um perfil de controle da doença semelhante ao grupo tratado com EGCG por via oral, apresentando diferenças significativas em relação ao grupo controle desde o início do tratamento. Trinta e dois dias após a infecção não houve diferença significativa no tratamento da EGCG por via oral com o tratamento realizado com antimoniato de meglumina por via intraperitoneal (Figura 26 inserto). Ao final do experimento (32º dia após a infecção), a carga parasitária foi determinada por diluição limitante e revelou uma diminuição significativa do número de parasitos por miligrama de tecido entre o grupo controle e o tratado, sem diferença significativa entre os grupos tratados com EGCG e antimoniato de meglumina (Figura 26b). Fotografias demonstraram diferenças no estágio da evolução da doença. Mesmo sendo caracterizado um perfil de cura espontânea da doença nesse modelo de animal ainda é possível observar em destaque uma lesão de leishmaniose em estágio de nódulo (Figura 26c). Esse estágio é caracterizado por uma epiderme intacta, com forte infiltrado de macrófagos e parasitos. Por outro lado, os grupos tratados com EGCG por via oral e antimoniato de meglumina (Figura 26d-e, respectivamente) apresentaram uma aparência característica de lesão cicatrizada, com leve depressão na pele, fibrose dérmica e com pouco parasito (Neves, 2005). Os principais marcadores sorológicos de toxicidade renal e hepática, como a creatinina e as transaminases, foram avaliados nos camundongos tratados com EGCG, antimoniato de meglumina e que receberam o veículo PBS. Todos os valores séricos se encontram dentro da faixa dos valores de referência (Figura 27). Além disso, nenhum sinal de toxicidade foi observado nos camundongos, como alterações comportamentais ou perda de peso.

6 CONCLUSÕES

- O tratamento com EGCG inibe de maneira dose-dependente a proliferação celular de promastigotas de *L. braziliensis*;
- EGCG é capaz de diminuir o índice de infecção de maneira dose-dependente em macrófagos murinos infectados com *L. braziliensis*, sendo seletivamente citotóxico para os parasitos intracelulares;
- O mecanismo de ação sugerido em promastigotas de *L. braziliensis* se dá pela inibição da tripanotona redutase, que causa desequilíbrio no balanço redox, gerando produção de peróxido de hidrogênio. Essa produção induz a uma diminuição do potencial de membrana mitocondrial, conseqüentemente diminuindo os níveis de ATP. Esse processo desencadeia a morte do parasito (Figura 28);
- Um mesmo mecanismo de ação pode ser proposto para amastigota com a inibição da tripanotona redutase, pois os resultados sugerem que a EGCG também induziu a formação de ERO nessa forma evolutiva (Figura 28);
- EGCG é capaz de controlar a progressão da leishmaniose em modelo murino por via oral, sem apresentar toxicidade ao camundongo. Essas características a torna um possível protótipo para o tratamento clínico da leishmaniose cutânea.

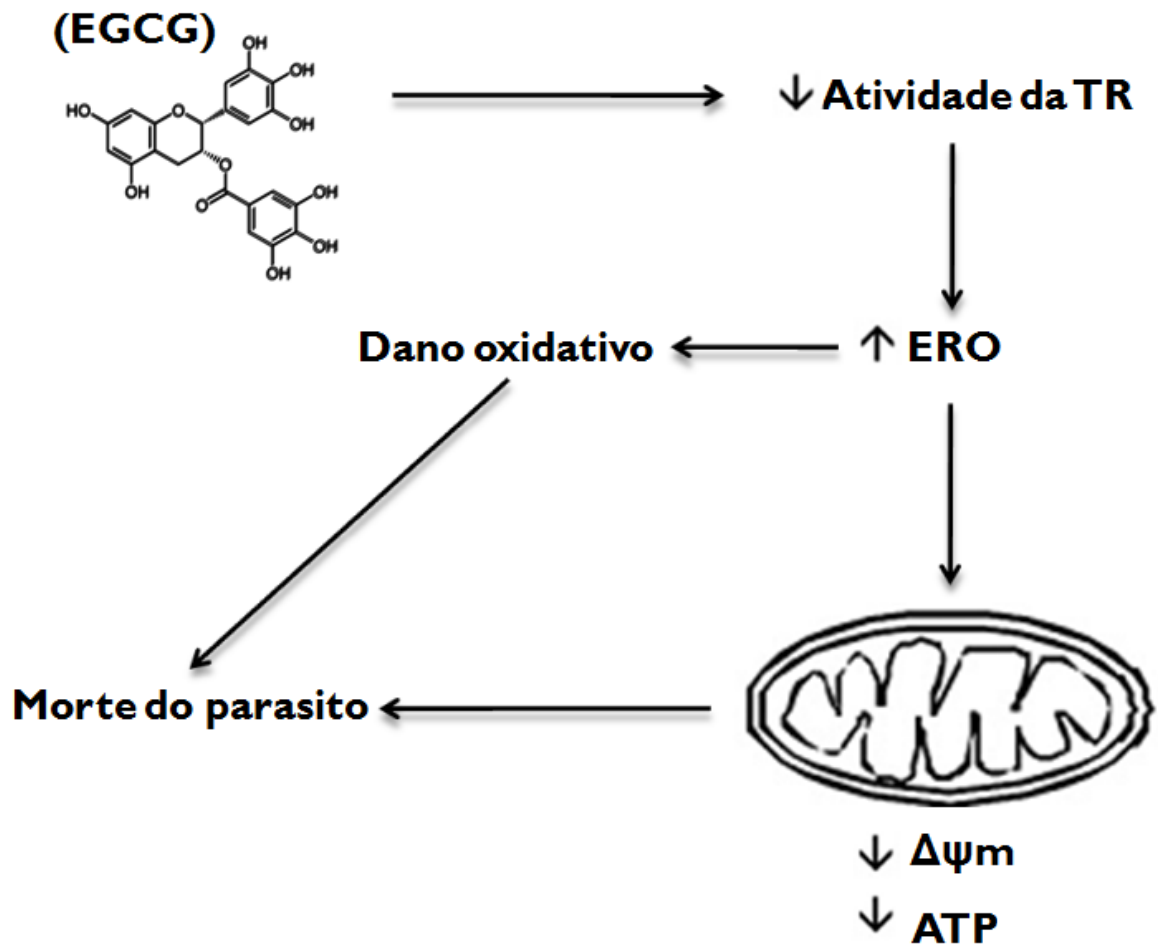


Figura 28 – Mecanismo de ação proposto da EGCG em promastigota e amastigota de *L. braziliensis*.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aboulaila M, Yokoyama N, Igarashi I. Inhibitory effects of (-)-epigallocatechin-3-gallate from green tea on the growth of *Babesia* parasites. *Parasitology*. 2010 137(5), 785-91.
- Affranchino JL, De Tarlovsky MN, Stoppani AO. Respiratory control in mitochondria from *Trypanosoma cruzi*. *Mol Biochem Parasitol*. 1985 16(3), 289-98.
- Alfonso-Prieto M, Vidossich P, Rovira C. The reaction mechanisms of heme catalases: an atomistic view by ab initio molecular dynamics. *Arch Biochem Biophys*. 2012 525(2), 121-30.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, Jannin J, den Bouer M, the WHO Leishmaniasis Control Team. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS One* 2012 7(5), e35671.
- Bailey MS, Lockwood DN. Cutaneous leishmaniasis. *Clin Dermatol* 2007 25 (2), 203-211.
- Berman JJ. Treatment of leishmaniasis with miltefosine: 2008 status. *Expert Opin Drug Metab Toxicol*. 2008 4(9), 1209-16.
- Bishayee K, Ghosh S, Mukherjee A, Sadhukhan R, Mondal J, Khuda-Bukhsh AR. Quercetin induces cytochrome-c release and ROS accumulation to promote apoptosis and arrest the cell cycle in G2/M, in cervical carcinoma: signal cascade and drug-DNA interaction. *Cell Prolif*. 2013 46(2),153-63.
- Boelaert M, Meheus F, Robays J, Lutumba P. Socio-economic aspects of neglected diseases: sleeping sickness and visceral leishmaniasis. *Ann Trop Med Parasitol* 2010 104(7), 535-42.
- Brieger K, Schiavone S, Miller FJ Jr, Krause KH. Reactive oxygen species: from health to disease. *Swiss Med Wkly*. 2012 142, w13659.
- Carvalho PB, Arribas MAG, Ferreira EI. Leishmaniasis: What do we know about its chemotherapy? *Braz J Pharm Sci*. 2000. 36: 69-96.
- Cavalli A, Bolognesi ML. Neglected tropical diseases: multi-target-directed ligands in the search for novel lead candidates against *Trypanosoma* and *Leishmania*. *J Med Chem* 2009 52 (23), 7339-7359.

- Chan-Bacab MJ, Peña-Rodríguez LM. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Nat Prod Rep*. 2001 18(6):674-88.
- Chang CS, Chang KP. Heme requirement and acquisition by extracellular and intracellular stages of *Leishmania mexicana amazonensis*. *Mol Biochem Parasitol* 1985 16(3), 267-76.
- Chang KP, Fong D. Cell biology of host-parasite membrane interactions in leishmaniasis. *Ciba Found Symp* 1983 99, 113-37.
- Chang KP. Cellular and molecular mechanisms of intracellular symbiosis in leishmaniasis. *Int Rev Cytol Suppl*. 1983 14, 267-305.
- Croft SL, Coombs GH. Leishmaniasis--current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. *Trends Parasitol*. 2003 19(11), 502-8.
- Czaplińska M, Czepas J, Gwoździński K. Structure, antioxidative and anticancer properties of flavonoids. *Postepy Biochem*. 2012 58(3), 235-44.
- Dardari Z, Lemrani M, Bahloul A, Sebban A, Hassar M, Kitane S, Berrada M, Boudouma M. Antileishmanial activity of a new 8-hydroxyquinoline derivative designed 7-[5'-(3'-phenylisoxazolino)methyl]-8-hydroxyquinoline: preliminary study. *Farmaco*. 2004 59(3);195-9.
- Das S, Das J, Samadder A, Boujedaini N, Khuda-Bukhsh AR. Apigenin-induced apoptosis in A375 and A549 cells through selective action and dysfunction of mitochondria. *Exp Biol Med (Maywood)*. 2012 237(12):1433-48.
- David CV, Craft N. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Dermatol Ther*. 2009 22(6), 491-502.
- de Moura TR, Novais FO, Oliveira F, Clarêncio J, Noronha A, Barral A, Brodskyn C, de Oliveira CI. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. *Infect Immun*. 2005 73(9), 5827-34.
- DNDi. Doenças negligenciadas: panorama. Acessado em 2012. Disponível em: <http://www.dndi.org.br/pt/doencas-negligenciadas.html>.
- Dogra J. A double-blind study on the efficacy of oral dapsone in cutaneous leishmaniasis. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1991 85(2), 212-3.
- EI-On J. Current status and perspectives of the immunotherapy of leishmaniasis. *Isr Med Assoc J*. 2009 11(10), 623-8.

- Fairlamb AH, Henderson GB, Cerami A. Trypanothione is the primary target for arsenical drugs against African trypanosomes. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1989 86(8), 2607-11.
- Fidalgo LM, Gille L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. *Pharm Res*. 2011 28(11), 2758-70.
- Fonseca-Silva F, Inacio JD, Canto-Cavalheiro MM, Almeida-Amaral EE. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. *PLoS One*. 2011 8 6(2), e14666.
- Galluzzi L, Kepp O, Kroemer G. Mitochondria: master regulators of danger signalling. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2012 13(12), 780-8.
- Gasser RA Jr, Magill AJ, Oster CN, Franke ED, Grögl M, Berman JD. Pancreatitis induced by pentavalent antimonial agents during treatment of leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. 1994 18(1), 83-90.
- Glew RH, Saha AK, Das S, Remaley AT. Biochemistry of the *Leishmania* species. *Microbiol Rev*. 1988 52(4), 412-32.
- Goodwin LG. Pentostam (sodium stibogluconate); a 50-year personal reminiscence. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1995 89 (3), 339-341.
- Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther*. 2010 8(4), 419-33.
- Grimaldi G Jr, Momen H, Naiff RD, McMahon-Pratt D, Barrett TV. Characterization and classification of leishmanial parasites from humans, wild mammals, and sand flies in the Amazon region of Brazil. *Am J Trop Med Hyg*. 1991 44(6), 645-61.
- Güida MC, Esteva MI, Camino A, Flawiá MM, Torres HN, Paveto C. *Trypanosoma cruzi*: in vitro and in vivo antiproliferative effects of epigallocatechin gallate (EGCg). *Exp Parasitol*. 2007 117(2), 188-94.
- Havsteen BH. The biochemistry and medical significance of the flavonoids. *Pharmacol Ther*. 2002 96(2-3), 67-202.
- He L, Zhang E, Shi J, Li X, Zhou K, Zhang Q, Le AD, Tang X. (-)-Epigallocatechin-3-gallate inhibits human papillomavirus (HPV)-16 oncoprotein-induced angiogenesis in non-small cell lung cancer cells by targeting HIF-1 α . *Cancer Chemother Pharmacol*. 2013 71(3), 713-25.

- Hoensch H, Oertel R. Anti-inflammatory effects of tea-flavonoids. *Dtsch Med Wochenschr.* 2012 137(51-52), 2738-40.
- Hunter WN, Bailey S, Habash J, Harrop SJ, Helliwell JR, Aboagye-Kwarteng T, Smith K, Fairlamb AH. Active site of trypanothione reductase. A target for rational drug design. *J Mol Biol.* 1992 227(1), 322-33.
- Inácio JD, Canto-Cavalheiro MM, Menna-Barreto RF, Almeida-Amaral EE. Mitochondrial damage contribute to epigallocatechin-3-gallate induced death in *Leishmania amazonensis*. *Exp Parasitol.* 2012 132(2), 151-5.
- Irigoín F, Cibils L, Comini MA, Wilkinson SR, Flohé L, Radi R. Insights into the redox biology of *Trypanosoma cruzi*: Trypanothione metabolism and oxidant detoxification. *Free Radic Biol Med.* 2008 45(6), 733-42.
- Khan N, Afaq F, Saleem M, Ahmad N, Mukhtar H. Targeting multiple signaling pathways by green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate. *Cancer Res.* 2006 1 66(5), 2500-5.
- Khouri R, Novais F, Santana G, de Oliveira CI, Vannier dos Santos MA, Barral A, Barral-Netto M, Van Weyenbergh J. DETC induces *Leishmania* parasite killing in human in vitro and murine in vivo models: a promising therapeutic alternative in Leishmaniasis. *PLoS One.* 2010 5(12), e14394.
- Stuart K, Brun R, Croft S, Fairlamb A, Gürtler RE, McKerrow J, Reed S, Tarleton R. Kinetoplastids: related protozoan pathogens, different diseases. *J Clin Invest.* 2008 118(4),1301-10.
- Krauth-Siegel RL, Comini MA. Redox control in trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. *Biochim Biophys Acta.* 2008 1780(11), 1236-48.
- Krauth-Siegel RL, Jacoby EM, Schirmer RH. Trypanothione and N1-glutathionylspermidine: isolation and determination. *Methods Enzymol.* 1995 251, 287-94.
- Krauth-Siegel RL, Inhoff O. Parasite-specific trypanothione reductase as a drug target molecule. *Parasitol Res.* 2003 90 Suppl 2:S77-85.
- Lainson R, Shaw JJ, Silveira FT. Dermal and visceral leishmaniasis and their causative agents. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1987 81(4), 702-3.
- Lazarin-Bidóia D, Desoti VC, Ueda-Nakamura T, Dias Filho BP, Nakamura CV, Silva SO. Further evidence of the trypanocidal action of eupomatenoïd-5: Confirmation

- of involvement of reactive oxygen species and mitochondria owing to a reduction in trypanothione reductase activity. *Free Radic Biol Med*. 2013 60C, 17-28.
- Lehane AM, Saliba KJ. Common dietary flavonoids inhibit the growth of the intraerythrocytic malaria parasite. *BMC Res Notes*. 2008 18, 1:26.
- Li W, Nie S, Yu Q, Xie M. (-)-Epigallocatechin-3-gallate induces apoptosis of human hepatoma cells by mitochondrial pathways related to reactive oxygen species. *J Agric Food Chem*. 2009 57(15), 6685-91.
- Lindoso JA, Lindoso AA. Neglected tropical diseases in Brazil. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 2009 51(5). 247-53.
- Llanos-Cuentas A, Echevarría J, Cruz M, La Rosa A, Campos P, Campos M, Franke E, Berman J, Modabber F, Marr J. Efficacy of sodium stibogluconate alone and in combination with allopurinol for treatment of mucocutaneous leishmaniasis. *Clin Infect Dis*. 1997 25(3), 677-84.
- Maltezou HC. Drug resistance in visceral leishmaniasis. *J Biomed Biotechnol* 2010 2010, 617521.
- Médicos sem fronteiras, 2001. Médicos sem fronteiras. Desequilíbrio Fatal. A crise de pesquisa e desenvolvimento de drogas para doenças negligenciadas. Campanha de acesso a medicamentos essenciais e grupo de trabalho de drogas para doenças negligenciadas. pp. 1-30. <http://msf.org.br>.
- Mehta A, Shaha C. Apoptotic death in *Leishmania donovani* promastigotes in response to respiratory chain inhibition: complex II inhibition results in increased pentamidine cytotoxicity. *J Biol Chem* 2004 279(12), 11798-813.
- Menna-Barreto RF, Corrêa JR, Pinto AV, Soares MJ, de Castro SL. Mitochondrial disruption and DNA fragmentation in *Trypanosoma cruzi* induced by naphthoimidazoles synthesized from beta-lapachone. *Parasitol Res*. 2007 101(4), 895-905.
- Menna-Barreto RF, Gonçalves RL, Costa EM, Silva RS, Pinto AV, Oliveira MF, de Castro SL. The effects on *Trypanosoma cruzi* of novel synthetic naphthoquinones are mediated by mitochondrial dysfunction. *Free Radic Biol Med* 2009 47(5), 644-53.
- Miguel DC, Zauli-Nascimento RC, Yokoyama-Yasunaka JK, Katz S, Barbiéri CL, Uliana SR. Tamoxifen as a potential antileishmanial agent: efficacy in the

- treatment of *Leishmania braziliensis* and *Leishmania chagasi* infections. J Antimicrob Chemother. 2009 63(2), 365-8.
- Ministério da Saúde. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana 2. ed. atual. 2007 1 (1), 1-140.
- Mishra BB, Singh RK, Srivastava A, Tripathi VJ, Tiwari VK. Fighting against Leishmaniasis: search of alkaloids as future true potential anti-Leishmanial agents. Mini Rev Med Chem 2009 9(1), 107-123.
- Mishra J, Saxena A, Singh S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. Curr Med Chem. 2007 14(10), 1153-69.
- Mukherjee P, Majee SB, Ghosh S, Hazra B. Apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes induced by diospyrin and its ethanolamine derivative. Int J Antimicrob Agents. 2009 34(6), 596-01.
- Ndjonka D, Rapado LN, Silber AM, Liebau E, Wrenger C. Natural products as a source for treating neglected parasitic diseases. Int J Mol Sci 2013 6 14(2), 3395-439
- Neuber H. Leishmaniasis. J Dtsch Dermatol Ges 2008 6(9), 754-65.
- Neves DP. Parasitologia Humana. 2005.11ª ed. São Paulo: Atheneu.
- OMS. Disponível em http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/. Acessado em 10/02/2013.
- Osman OF, Kager PA, Oskam L. Leishmaniasis in the Sudan: a literature review with emphasis on clinical aspects. Trop Med Int Health. 2000 5(8), 553-62
- Pal C, Bandyopadhyay U. Redox-active antiparasitic drugs. Antioxid Redox Signal. 2012 17(4), 555-82.
- Paris C, Loiseau PM, Bories C, Breard J. Miltefosine induces apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes. Antimicrob Agents Chemother 2004 48(3), 852-859.
- Piscopo TV, Mallia AC. Leishmaniasis. Postgrad Med J 2006 82 (972), 649-657.
- Polonio T, Efferth T. Leishmaniasis: drug resistance and natural products (review). Int J Mol Med. 2008 22(3),277-86

- Reithinger R, Dujardin JC, Louzir H, Pirmez C, Alexander B, Brooker S. Cutaneous leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* 2007 7(9), 581-96.
- Remme JH, Blas E, Chitsulo L, Desjeux PM, Engers HD, Kanyok TP, Kengeya Kayondo JF, Kioy DW, Kumaraswami V, Lazdins JK, Nunn PP, Oduola A, Ridley RG, Toure YT, Zicker F, Morel CM. Strategic emphases for tropical diseases research: a TDR perspective. *Trends Parasitol* 2002 18(10), 421-6.
- Rey L. *Parasitologia*. 2008.4^a ed. Guanabara Koogan.
- Ricci AG, Olivares CN, Bilotas MA, Bastón JI, Singla JJ, Meresman GF, Barañao RI. Natural therapies assessment for the treatment of endometriosis. *Hum Reprod*. 2013 28(1), 178-88.
- Rodrigues RF, Castro-Pinto D, Echevarria A, dos Reis CM, Del Cistia CN, Sant'Anna CM, Teixeira F, Castro H, Canto-Cavalheiro M, Leon LL, Tomás A. Investigation of trypanothione reductase inhibitory activity by 1,3,4-thiadiazolium-2-aminide derivatives and molecular docking studies. *Bioorg Med Chem*. 2012 20(5), 1760-6.
- Roy A, Ganguly A, BoseDasgupta S, Das BB, Pal C, Jaisankar P, Majumder HK. Mitochondria-dependent reactive oxygen species-mediated programmed cell death induced by 3,3'-diindolylmethane through inhibition of F0F1-ATP synthase in unicellular protozoan parasite *Leishmania donovani*. *Mol Pharmacol*. 2008 74(5), 1292-307.
- Sacks D, Kamhawi S. Molecular aspects of parasite-vector and vector-host interactions in leishmaniasis. *Annu Rev Microbiol*. 2001 55, 453-83.
- Sacks DL. Metacyclogenesis in *Leishmania* promastigotes. *Exp Parasitol*. 1989 69(1), 100-3.
- Santa-Rita RM, Barbosa HS, de Castro SL. Ultrastructural analysis of edelfosine-treated trypomastigotes and amastigotes of *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res*. 2006 100(1), 187-90.
- Santos DO, Coutinho CE, Madeira MF, Bottino CG, Vieira RT, Nascimento SB, Bernardino A, Bourguignon SC, Corte-Real S, Pinho RT, Rodrigues CR, Castro HC. Leishmaniasis treatment-a challenge that remains: a review. *Parasitol Res*. 2008 103(1), 1-10.
- Savioli S, Ardizzoni A, Franceschi C, Cossarizza A. JC-1, but not DiOC6(3) or rhodamine 123, is a reliable fluorescent probe to assess $\Delta\Psi$ changes in intact

- cells: implications for studies on mitochondrial functionality during apoptosis. *FEBS Lett* 1997 411(1), 77-82.
- Schirmer RH, Schöllhammer T, Eisenbrand G, Krauth-Siegel RL. Oxidative stress as a defense mechanism against parasitic infections. *Free Radic Res Commun*. 1987 3(1-5), 3-12.
- Shaha C. Apoptosis in *Leishmania* species & its relevance to disease pathogenesis. *Indian J Med Res*. 2006 123(3), 233-44.
- Shankar S, Marsh L, Srivastava RK. EGCG inhibits growth of human pancreatic tumors orthotopically implanted in BALB/c nude mice through modulation of FKHL1/FOXO3a and neuropilin. *Mol Cell Biochem*. 2013 372(1-2), 83-94.
- Shukla AK, Singh BK, Patra S, Dubey VK. Rational approaches for drug designing against leishmaniasis. *Appl Biochem Biotechnol*. 2010 160(8), 2208-18.
- Simpson L. The mitochondrial genome of kinetoplastid protozoa: genomic organization, transcription, replication, and evolution. *Annu Rev Microbiol* 1987 41, 363-82
- Singh N, Kaur J, Kumar P, Gupta S, Singh N, Ghosal A, Dutta A, Kumar A, Tripathi R, Siddiqi MI, Mandal C, Dube A. An orally effective dihydropyrimidone (DHPM) analogue induces apoptosis-like cell death in clinical isolates of *Leishmania donovani* overexpressing pteridine reductase 1. *Parasitol Res* 2009 105(5), 1317-1325.
- Singh S, Sivakumar R. Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *J Infect Chemother* 2004 10(6), 307-315.
- Suh KS, Chon S, Oh S, Kim SW, Kim JW, Kim YS, Woo JT. Prooxidative effects of green tea polyphenol (-)-epigallocatechin-3-gallate on the HIT-T15 pancreatic beta cell line. *Cell Biol Toxicol*. 2010 26(3), 189-99.
- Sundar S, Chakravarty J. Paromomycin in the treatment of leishmaniasis. *Expert Opin Investig Drugs*. 2008 17(5), 787-94.
- Sundar S, Sinha PR, Agrawal NK, Srivastava R, Rainey PM, Berman JD, Murray HW, Singh VP. A cluster of cases of severe cardiotoxicity among kala-azar patients treated with a high-osmolarity lot of sodium antimony gluconate. *Am J Trop Med Hyg*. 1998 59(1), 139-43.

- TDR at a glance: Foresting an effective global research effort on diseases on poverty. TDR 2010. Disponível em <http://www.who.int/tdr/publications/about-tdr/strategy/tdr-glance/en/index.html>. Acessado em 10/02/2013.
- Turetz ML, Machado PR, Ko AI, Alves F, Bittencourt A, Almeida RP, Mobashery N, Johnson WD Jr, Carvalho EM. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. *J Infect Dis.* 2002;186(12), 1829-34.
- van Zandbergen G, Klinger M, Mueller A, Dannenberg S, Gebert A, Solbach W, Laskay T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages. *J Immunol* 2004 173(11), 6521-5.
- Vannier-Santos MA, Martiny A, de Souza W. Cell biology of *Leishmania spp.*: invading and evading. *Curr Pharm Des.* 2002 8(4), 297-318.
- Verschooten L, Barrette K, Van Kelst S, Rubio Romero N, Proby C, De Vos R, Agostinis P, Garmyn M. Autophagy inhibitor chloroquine enhanced the cell death inducing effect of the flavonoid luteolin in metastatic squamous cell carcinoma cells. *PLoS One.* 2012 7(10), e48264.
- Vianna G. Comunicação à Sessão de 24 de abril de 1912 da Sociedade Brasileira de Dermatologia. *Bol. Soc. Brasil. Dermat* 1912 1, 436-438
- Weniger B, Robledo S, Arango GJ, Deharo E, Aragón R, Muñoz V, Callapa J, Lobstein A, Anton R. Antiprotozoal activities of Colombian plants. *J Ethnopharmacol.* 2001 78(2-3), 193-200.
- Weston LA, Mathesius U. Flavonoids: their structure, biosynthesis and role in the rhizosphere, including allelopathy. *J Chem Ecol.* 2013 39(2), 283-97.
- WHO. Report of a meeting of the WHO expert committee on the control of Leishmaniasis. WHO, 2010.
- WHO. Working to overcome the global impact of neglected tropical diseases. WHO, 2012.
- Yang CS, Hong J, Hou Z, Sang S. Green tea polyphenols: antioxidative and prooxidative effects. *J Nutr.* 2004 134(11), 3181S.
- Zhou L, Elias RJ. Antioxidant and pro-oxidant activity of (-)-epigallocatechin-3-gallate in food emulsions: Influence of pH and phenolic concentration. *Food Chem.* 2013 138(2-3), 1503-9.