



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**

**PÓS-GRADUAÇÃO**

**REDE NORDESTE DE BIOTECNOLOGIA - RENORBIO**

**Estudo *in vitro* e *in vivo* da atividade Leishmanicida do extrato acetato de etila de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. frente à *Leishmania (Viannia) braziliensis***

**Thially Braga Gonçalves**

**FORTALEZA-CEARÁ,**

**FEVEREIRO DE 2017.**

**Thially Braga Gonçalves**

**Estudo *in vitro* e *in vivo* da atividade Leishmanicida do extrato acetato de etila de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. frente à *Leishmania (Viannia) braziliensis***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) afim de apreciação pela banca de defesa como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia área de concentração Desenvolvimento de agentes profiláticos, terapêuticos e testes diagnósticos.

**Orientadora: Profa. Dr<sup>a</sup> Aparecida Tiemi Nagao-Dias**

FORTALEZA-CEARÁ,

FEVEREIRO DE 2017.

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

G629e Gonçalves, Thially Braga.

Estudo in vitro e in vivo da atividade Leishmanicida do extrato acetato de etila de *Plectranthusamboinicus* (Lour.) Spreng. frente à *Leishmania (Viannia) braziliensis* / Thially Braga Gonçalves. – 2017.  
138 f. : il. color.

Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (Rede Nordeste de Biotecnologia), Fortaleza, 2017.

Orientação: Prof. Dr. Aparecida Tiemi Nagao-Dias.

1. *Leishmania braziliensis*. 2. *Plectranthusamboinicus*. 3. Leishmaniose cutânea. I. Título.

CDD 660.6

---

**Thially Braga Gonçalves**

**Estudo *in vitro* e *in vivo* da atividade Leishmanicida do extrato acetato de *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. frente a *Leishmania (Viannia) braziliensis***

Tese apresentada ao Curso de Pós-Graduação em Biotecnologia da Rede Nordeste de Biotecnologia (RENORBIO) afim de apreciação pela banca de defesa como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Biotecnologia área de concentração Desenvolvimento de agentes profiláticos, terapêuticos e testes diagnósticos.

**A comissão julgadora em sessão pública realizada em 24 de Fevereiro de 2017 considera a candidata \_\_\_\_\_**

---

**Profa. Dra. Aparecida Tiemi Nagao-Dias  
(Orientadora)**

---

**Profa. Dra. Maria Jania Teixeira  
(Membro externo)**

---

**Prof. Dr. José Galberto Martins Costa  
(Membro interno)**

---

**Prof. Dr. Hélio Vitoriano Nobre Junior  
(Membro externo)**

---

**Profa. Dra. Danielle Malta Lima  
(Membro Interno)**

*A Deus,*

*Aos meus queridos pais, irmão e  
esposo, incentivadores e amigos de todas as horas.*

*Com muito amor, dedico.*

## AGRADECIMENTOS

---

*Ao meu maravilhoso Deus pelo dom da vida, sem a sua presença em minha vida eu não teria forças para concluir este objetivo e por colocar sempre em minha vida as pessoas certas nos momentos certos.*

*Aos meus pais, José Gonçalves e Vilma, por na sua simplicidade, serem os maiores exemplos de como enfrentar as adversidades que nos aparecem na vida, por me aconselharem, e me inspirarem a sempre procurar crescer, superar meus limites, enfrentar meus medos e nunca me deixar fraquejar e desistir.*

*À minha família, irmão, Thiago, cunhada, Jadna e sobrinhas Lis e Isis, que tanto enchem meu coração de felicidade e esperança e aos meus sogros, D. Laice e Sr. Iari (in memorian), sou muito grata a todos pelo apoio, incentivo, pelas palavras de conforto nos momentos difíceis e pela compreensão por não poder estar presente em todos os momentos.*

*Ao meu querido esposo Yuri Lacerda, por ser o melhor companheiro para a vida que alguém pode ter, por todo amor dedicado, companheirismo, compreensão e ajuda na execução desse trabalho, direta e indiretamente. Pela sua grandiosa força, apoio, garra e generosidade em conseguir suportar a sua finalização de tese e me dar suporte para a minha. Melhor não poderia ser, passarmos por esse desafio juntos.*

*À minha orientadora, Profa. Dra. Aparecida Tiemi Nagao-Dias, pelo todo o tempo dedicado, pelos grandiosos ensinamentos e sabedoria.*

*À Profa. Maria Jania Teixeira por me acolher tão afetuosamente em seu laboratório para a execução desse trabalho, por todo o suporte técnico-científico, ensinamentos e sabedoria.*

*À Profa. Dra. Margarida Pompeu, Profa. Dra. Gilvandete Santiago, Dr. Kirley Canuto, Dr. Paulo Ribeiro pela acolhida em seus laboratórios e pelas importantes contribuições neste trabalho.*

*Aos membros da banca examinadora, Prof. Dr. José Galberto Martins Costa, Profa. Dra. Danielle Malta Lima, Prof. Dr. Helio Vitoriano Nobre Júnior e Profa. Dra. Maria Jania Teixeira, por terem aceitado gentilmente participar da avaliação desse trabalho.*

*Aos meus professores do programa de doutorado (RENORBIO - UFC) por tantos conhecimentos transmitidos. Bem como, ao coordenador Prof. Dr. Arlindo Moura e o secretário Adil de Oliveira por sempre ajudar quando necessário.*

*Aos amigos do Laboratório de Imunologia, Profa. Juliana, Profa. Zirlane, Milena, Raphael, Evandro, Fábio, Luciana, Thiago, Pedro, Renata, pela amizade, companheirismo, bons momentos compartilhados e colaborações.*

*Às alunas de iniciação científica Juliana Guimarães e Marilia Lopes pelas contribuições na execução dos experimentos e amizade.*

*Aos amigos do Laboratório de Parasitologia, Naya, Weberty, Rafael, Bruni, Alan, Bruna, Mércia, Rafaele, Carrel, Priscila, Aline, João, Profa. Kelma, Prof. Josias, Profa. Cristina, pelos difíceis e alegres dias de experimentos compartilhados, pelos grandes momentos de aprendizado e amizade.*

*Às amigas, Milena Esmeraldo e Camila Nobre que o doutorado me presenteou e demais amigos de turma de doutorado.*

*Aos amigos Paula, Marcella, Jota, Gabriele, Thiago, Ramon, Max, Pablo e Argus pela constante amizade, por tornarem minha vida em Fortaleza muito melhor, meus dias mais leves e fáceis de suportar.*

*Às minhas amigas companheiras de apartamento Eglidia e Luciane pela tão agradável e fácil convivência.*

*À Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico – FUNCAP pelo auxílio financeiro.*

*“Tudo o que um sonho precisa para ser realizado é alguém que acredite que ele possa ser realizado”.*

*Roberto Shinyashiki*



## RESUMO

Leishmanioses cutâneas são antropozoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania* no qual *Leishmania braziliensis* é a principal espécie no Brasil. *Plectranthus amboinicus*, conhecida popularmente como malvarisco, pertence à família Lamiaceae, com grande importância econômica por possuir amplo uso medicinal. Neste trabalho, avaliou-se o efeito *in vitro* e *in vivo* do extrato acetato de etila de *Plectranthus amboinicus* (EAEPA) na infecção por *L. braziliensis*. Os extratos hexano, diclorometano e acetato de etila de *P. amboinicus* foram inicialmente testados *in vitro* quanto à atividade contra as formas promastigotas de *Leishmania*. Uma vez que o EAEPA mostrou a inibição de 98,5% de promastigotas na concentração 4mg/mL, foi selecionado para os demais ensaios *in vitro* e *in vivo*. A composição química de EAEPA foi analisada por UPLC-QTOF-MS. Para avaliar o efeito contra as formas amastigotas, macrófagos intraperitoneais murinos foram infectados ou não com *L. braziliensis* e tratados com diferentes concentrações de EAEPA, por 24h. Foram analisadas a citotoxicidade, carga parasitária e a produção de citocinas. Para o ensaio *in vivo*, Hamsters (*Mesocricetus auratus*; n=20) foram infectados com  $10^6$  promastigotas e camundongos BALB/c (n=15) com  $10^7$  de *L. braziliensis* no coxim da pata direita e na orelha direita, respectivamente. Após o aparecimento das lesões, os Hamsters foram divididos em 4 grupos que receberam os seguintes tratamentos: DMSO 1%; Antimônio (20mg/kg/dia, I.M.,30 dias); EAEPA (4mg/kg I.P. e I.L.,30 dias), Os camundongos BALB/c foram divididos em três grupos: DMSO 1%; Antimônio (20mg/kg/dia, I.M.,15 dias); EAEPA (250mg/kg/dia, I.P.,15 dias). Em seguida, avaliou-se espessura da lesão, a carga parasitária e realizou-se análises histopatológicas. A análise fitoquímica de EAEPA revelou a presença de flavonoides, glicosídeos digitálicos, taninos e esteroides. A identificação dos compostos químicos de EAEPA revelou a presença de ácido quinico, ácido protocatecuico, ácido cafeico, cumaroilmalato, timoquinona, ácido siríngico, ácido rosmarinico, luteolina, apigenina, tricine e cirsimaritina. Os resultados *in vitro* mostraram que EAEPA apresentou citotoxicidade a partir da concentração 0,125mg/mL com 43% de inibição do crescimento celular. O tratamento com EAEPA *in vitro* mostrou redução significativa da carga parasitária a partir da concentração 0,03mg/mL. Nas células tratadas com EAEPA, observou-se aumento dos níveis de TNF $\alpha$  e IL-10, manutenção dos níveis de TGF $\beta$ ; e diminuição da produção de IL-4. Nos experimentos *in vivo*, EAEPA administrado via intraperitoneal reduziu eficientemente a espessura da lesão, a carga parasitária e os parâmetros inflamatórios em Hamsters e em camundongos BALB/c, comparados ao controle não tratado. Em suma, os dados mostraram que, em animais

infectados com *L. braziliensis*, EAEPA foi capaz de induzir o controle da lesão, sugerindo que isso possa ocorrer em função da diminuição da carga parasitária, bem como, através de uma imunorregulação do processo inflamatório. A ação leishmanicida de *Plectranthus amboinicus* elucidada nesse trabalho através do tratamento em dois modelos animais de infecção por *Leishmania braziliensis* abre possibilidades ao desenvolvimento de um novo fitoterápico capaz de diminuir a parasitemia ou até mesmo a cura, com baixa toxicidade e poucos efeitos adversos.

**Palavras-chave:** *Leishmania braziliensis*. *Plectranthus amboinicus*. Leishmaniose cutânea.

## ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis are anthroponoses caused by protozoa of the *Leishmania* genus. *Leishmania braziliensis* is most popular specie in Brazil. *Plectranthus amboinicus*, popularly known in Brazil as “malvarisco”, belongs to the family Lamiaceae. It has a great economic importance because of its widely medicinal use. In this work, the *in vitro* and *in vivo* effect of the ethyl acetate extracted of *Plectranthus amboinicus* (EAEPA) on *L. braziliensis* infection has been evaluated. The extracts of hexane, dichloromethane and ethyl acetate of *P. amboinicus* were initially tested *in vitro* for activity against Leishmania promastigotes. Since the EAEPA has shown the inhibition of 98.5% promastigotes at the concentration 4mg/mL, it was selected for the *in vivo* assays. To evaluate the effect against amastigote forms, murine intraperitoneal macrophages were infected or not with *L. braziliensis* and treated with different concentrations of EAEPA for 24h. Cytotoxicity, parasite load, and cytokine production have been analyzed. For the *in vivo* assay, Hamsters (*Mesocricetus auratus*; n = 20) were infected with  $10^6$  promastigotes and BALB/c mice (n = 15) with  $10^7$  of *L. braziliensis* on the right paw cushion and on the right ear, respectively. After the appearance of the lesions, the Hamsters were divided in 4 groups that received the following treatments: DMSO 1%; Antimony (20mg / kg / day, IM, 30 days); EAEPA (4mg / kg I.P. and I.L., 30 days). The BALB/c mice were divided into three groups: DMSO 1%, Antimony (20mg / kg / day, IM, 15 days), EAEPA (250mg / kg / day, PI, 15 days). Afterwards, the lesion thickness and parasite load have been evaluated and histopathological analyses have been done. Phytochemical analysis of EAEPA revealed the presence of flavonoids, digitalis glycosides, tannins and steroids. *In vitro* results have presented that EAEPA exhibited cytotoxicity from the 0.125 mg / mL concentration with 43% inhibition of cell growth. Treatment with EAEPA *in vitro* has presented a significant reduction of parasite load from the 0.03 mg/mL concentration. In cells treated with EAEPA, increased levels of TNF- $\alpha$  and IL-10, maintenance of TGF- $\beta$  levels, and decreased IL-4 production have been observed. *In vivo* experiments, EAEPA administered intraperitoneally efficiently reduced lesion thickness, parasite load, and inflammatory parameters in Hamsters and BALB/c mice, compared to the untreated control. In summary, EAEPA was able to induce control of the lesion in the animals infected with *L. braziliensis*. It suggests that this may occur because the reduction of parasitic load, such as through immunoregulation of the inflammatory process. The leishmanicidal action of *Plectranthus amboinicus* elucidated in this work through the treatment in two animal

models of infection by *Leishmania braziliensis* opens possibilities for the development of a new herbal medicine capable of reducing parasitemia or even cure, with low toxicity and few adverse effects.

**Keywords:** *Leishmania braziliensis*. *Plectranthus amboinicus*. Cutaneous leishmaniasis.

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

EAEPA	Extrato Acetato de Etila de <i>Plectranthus amboinicus</i>
ELISA	Enzyme Linked Immunosorbent Assay
EP	Erro padrão
IFN- $\gamma$	Interferon gama
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintetase induzida
LCL	Leishmaniose cutânea localizada
LD	Leishmaniose disseminada
LCM	Leishmaniose cutâneo-mucosa
LTA	Leishmaniose tegumentar americana
LV	Leishmaniose visceral
MIP-1 $\beta$	Proteína inflamatória de macrófagos 1 beta
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MS	Ministério da Saúde
NK	Natural Killer
NO	Óxido nítrico
OMS/WHO	Organização Mundial da Saúde
SBF	Soro bovino fetal
SVS/MS	Secretaria de Vigilância em Saúde / Ministério da Saúde
TGF- $\beta$	Fator de transformação do crescimento $\beta$
Th	T helper (T auxiliar)
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa

## SUMÁRIO

---

CAPÍTULO I - INTRODUÇÃO E OBJETIVOS.....	15
1.1 INTRODUÇÃO .....	16
1.2 OBJETIVOS .....	18
1.2.1. OBJETIVO GERAL .....	18
1.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	18
CAPÍTULO II - REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1 LEISHMANIOSE.....	20
2.1.1 ASPECTOS GERAIS .....	20
2.1.2 FORMAS CLÍNICAS .....	24
2.1.3 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR .....	25
2.1.4 IMUNOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA.....	26
2.1.5 MODELOS EXPERIMENTAIS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA POR <i>L. braziliensis</i> .....	30
2.1.6 TRATAMENTO .....	34
2.2 PLANTAS MEDICINAIS COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA .....	36
2.2.1 PLANTAS COM AÇÃO LEISHMANICIDA.....	37
2.2.2 <i>Plectranthus amboinicus</i> .....	40
CAPÍTULO III - MATERIAIS E MÉTODOS .....	45
3.1 COMITÊ DE ÉTICA PARA PESQUISA ANIMAL (CEPA) .....	46
3.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS .....	46
3.2.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS .....	46
3.3. PARASITOS.....	47
3.4 ENSAIOS <i>IN VITRO</i> .....	47
3.4.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CONTRA FORMAS PROMASTIGOTAS.....	48
3.4.2. OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS.....	49
3.4.3. TESTE DE CITOTOXICIDADE .....	49
3.4.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CONTRA FORMAS AMASTIGOTAS.....	50
3.4.5 DOSAGEM DE CITOCINAS .....	50
3.5. ENSAIOS <i>IN VIVO</i> .....	51
3.5.1 ANIMAIS.....	51
3.5.2 TOXICIDADE AGUDA E DETERMINAÇÃO DA DL <sub>50</sub> .....	51
3.5.3. MODELO EXPERIMENTAL DE INFECÇÃO.....	52
3.5.4. TRATAMENTO .....	53
3.5.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO TERAPÊUTICO DA AMOSTRA VEGETAL .....	53

3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	55
CAPÍTULO IV - ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF <i>Plectranthusamboinicus</i> IN HAMSTERS INFECTED WITH <i>Leishmania (VIANNIA) braziliensis</i> - ARTIGO I - SUBMETIDO À PARASITOLOGY RESEARCH .....	57
CAPÍTULO V - ATIVIDADE LEISHMANICIDA <i>IN VITRO</i> E <i>IN VIVO</i> DO EXTRATO ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS DE <i>Plectranthusamboinicus</i> CONTRA <i>Leishmania (VIANNIA) braziliensis</i> - ARTIGO II- EM ELABORAÇÃO .....	77
CAPÍTULO VI - CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS .....	116
CONCLUSÕES .....	117
PERSPECTIVAS FUTURAS.....	119
REFERÊNCIAS .....	120
APÊNDICES .....	133
APÊNDICE A.....	134
DEPÓSITO DE PATENTE .....	134
APÊNDICE B .....	135
ARTIGOS E COMUNICAÇÕES - 2012-2016 .....	135
ANEXOS.....	139
ANEXO A.....	140
COMITÊ DE ÉTICA .....	140

**CAPÍTULO I**

**INTRODUÇÃO E OBJETIVOS**

---



## 1.1 INTRODUÇÃO

---

As leishmanioses são antropozoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, consideradas um grande problema de saúde pública e representam um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam vivendo em áreas de transmissão de leishmaniose em 98 países do mundo, com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas a cada ano (KEDZIERSKI, 2010; WHO, 2012).

Por se tratar de um complexo grupo de doenças quanto às diferenças no quadro clínico e epidemiológico, as leishmanioses foram diferenciadas em Leishmaniose Visceral (LV), também conhecida como calazar, e a Leishmaniose Tegumentar (LT), cujas formas são: cutânea e mucocutânea. Como se trata de uma doença crônica, pode se apresentar inaparente ao longo de anos ou evoluir com o surgimento de lesões cutâneas, localizadas geralmente em áreas mais expostas do corpo. A capacidade infectiva da *Leishmania* depende da virulência do parasito, bem como do tipo de resposta imune do hospedeiro (MURRAY, 2006).

A quimioterapia de primeira escolha baseia-se em antimoniais pentavalentes complexados a carboidratos, na forma de estibogluconato de sódio (Pentostan®) e antimoniato de meglumina (Glucantime®). Tais medicamentos possuem elevada toxicidade e podem levar à resistência do microrganismo. O uso continuado dos medicamentos pode provocar seu acúmulo em órgãos como baço e fígado, além de causar efeitos adversos como mialgia, pancreatite, arritmia cardíaca e hepatite, efeitos esses que levam ao abandono do tratamento (CHAN-BACAB; PEÑA-RODRIGUEZ, 2001; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). A segunda escolha para o tratamento, Anfotericina B, é o primeiro medicamento oral efetivo contra a leishmaniose cutânea, empregado na Colômbia, e contra a visceral, utilizado na Índia (SOTO, et al., 2004; SUNDAR, 2010). Ela também possui uma alta toxicidade, e embora exista uma formulação lipídica, de menor toxicidade, esta é muito cara para uso na rotina clínica em países em desenvolvimento (MEHEUS et al., 2010).

Como a variabilidade quanto à eficácia do tratamento com antimoniais na leishmaniose tem sido um problema recorrente, fármacos alternativos e novas formulações estão sendo desenvolvidos (SEIFERT, K. & CROFT, 2004).

A busca de compostos que possibilitem o desenvolvimento de novos fármacos efetivos, mais seguros, com baixo custo, sem efeitos colaterais e que não induzam resistência

é essencial. Plantas medicinais com propriedades anti-protozoárias constituem uma excelente oportunidade para pesquisadores dos campos da Botânica, Fitoquímica, Parasitologia, Farmacologia e Medicina (BILLO et al., 2005).

Relatos de metabólitos secundários com atividade leishmanicida têm sido descritos na literatura (CHAN-BACAB e PENA-RODRIGUEZ, 2001), e incluem naftoquinonas (TASDEMIR et al., 2006), lignanas (SAUVAIN et al., 1996), triterpenos (SAUVAIN et al., 1996), biflavonóides (ASSIS et al., 2012), neolignanas (BARATA et al., 2000), alcalóides (DELORENZI et al., 2001), chalconas (TORRES-SANTOS et al., 1999) e benzofenonas (PEREIRA et al., 2010).

Baseado em uma experiência prévia de nosso grupo de pesquisa do Laboratório de Imunologia da Universidade Federal do Ceará com a espécie *Plectranthus amboinicus* (Lour) Spreng contra *Klebsiella pneumoniae* (GONÇALVES et al., 2012) e contra *Staphylococcus aureus* (OLIVEIRA et al., 2013), decidiu-se avaliar no presente trabalho a atividade *in vitro* e *in vivo* de *P. amboinicus* contra *L. braziliensis*. Este projeto foi antecedido por outro estudo, onde foi possível demonstrar atividade leishmanicida *in vitro* e *in vivo* de *Astronium fraxinifolium* e do óleo essencial de *P. amboinicus* contra *L. (V.) braziliensis*, utilizando o modelo do hamster (LIMA et al., 2014), do qual foi gerado um depósito de patente.

## 1.2 OBJETIVOS

---

### 1.2.1. Objetivo geral

---

Avaliar atividade leishmanicida *in vitro* e *in vivo* de *Plectranthus amboinicus* frente à cepa de *L. (V.) braziliensis* resistente ao tratamento com antimônio.

### 1.2.1 Objetivos específicos

---

- Obter e realizar a caracterização fitoquímica dos extratos em hexano, diclorometano, acetato de etila e etanólico das folhas de *P. amboinicus*;
- Realizar *screening in vitro* da ação dos extratos vegetais sobre as formas promastigotas da *L. braziliensis*;
- Avaliar a composição química do extrato acetato de etila de *Plectranthus amboinicus* (EAEPA);
- Analisar a citotoxicidade dos extratos em macrófagos murinos intraperitoneais;
- Avaliar a atividade dos extratos vegetais em macrófagos murinos intraperitoneais infectados com as formas amastigotas de *L. braziliensis*;
- Determinar a concentração das citocinas TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10 e TGF- $\beta$  em sobrenadantes de cultura de macrófagos infectados;
- Avaliar a toxicidade *in vivo* de EAEPA;
- Verificar a atividade terapêutica de EAEPA em modelo de infecção experimental em hamsters;
- Observar a atividade terapêutica EAEPA em modelo de infecção experimental em camundongos BALB/c.

**CAPÍTULO II**

**REVISÃO DE LITERATURA**

---

## 2.1 LEISHMANIOSE

---

### 2.1.1 ASPECTOS GERAIS

---

As leishmanioses estão entre as doenças tropicais mais negligenciadas no mundo, sendo consideradas um sério problema de saúde pública. Estima-se que a cada ano, surjam 350 milhões de pessoas com risco de contrair uma das formas clínicas da doença (KEDZIERSKI, 2010).

A Leishmaniose tegumentar (LT) consiste de um conjunto de doenças infecciosas causadas por várias espécies de protozoários digenéticos da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae, gênero *Leishmania*, (Figura 1). Acometem a pele e/ou mucosas do homem, e de várias espécies de animais silvestres e domésticos das regiões tropicais e subtropicais do Velho e Novo Mundo. Nas Américas, são transmitidas através da picada das fêmeas de algumas espécies de flebotomíneos (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae), gêneros *Lutzomyia* e *Psychodopygus*. A infecção é caracterizada por parasitismo das células do sistema fagocítico mononuclear da derme e das mucosas (ADL et al., 2005; BRASIL, 2010; OMS, 2010).

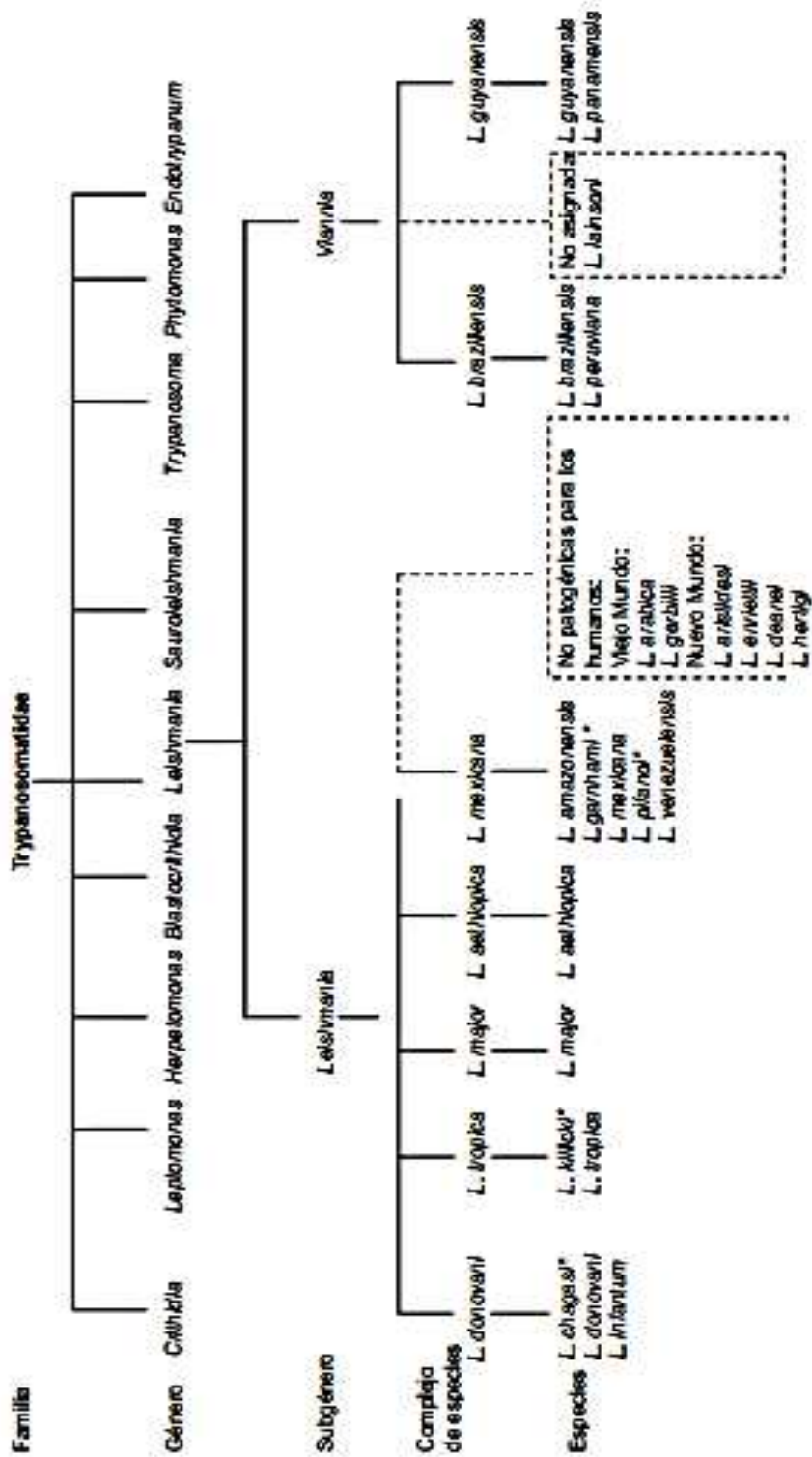
Em meados do século XX, a LT já era conhecida como um grupo de doenças dermatológicas semelhantes entre si, sendo que sua apresentação clínica era associada a lesões cutâneas, geralmente ulcerosas, com comprometimento da mucosa oronasal. No Brasil, em 1908, houve uma epidemia em Bauru/SP, quando Lindemberg (1909) correlacionou a “úlceras de Bauru” com o “botão do Oriente” e o seu agente causal como *Leishmania tropica*. Carini (1911) e Splendore (1912) realizaram observações pioneiras de lesões mucosas confirmadas pela demonstração de leishmanias. Vianna (1911) considerou que havia diferenças morfológicas entre a *Leishmania tropica* e o agente etiológico da leishmaniose cutânea (LC) e a chamou de *Leishmania braziliensis*. Posteriormente, Rabello (1923) criou o termo leishmaniose tegumentar americana (LTA), denominação que abrange tanto a forma cutânea como a forma mucosa da doença (BRASIL, 2006).

Lainson & Shaw (1978) deram um novo impulso ao conhecimento da LTA na Região Amazônica, quando baseados em critérios clínicos, epidemiológicos e biológicos, propuseram

uma nova classificação da *Leishmania* no Novo Mundo, dividindo-a em dois grandes grupos: o complexo *Leishmania mexicana* e o *Leishmania braziliensis*. Em 1987, foi proposta uma nova classificação com adoção dos subgêneros *Leishmania* (SAF'IANOVA, 1982 *apud* BRASIL, 2006) e *Viannia* (LAINSON; SHAW, 1987 *apud* BRASIL, 2006).

Protozoários do gênero *Leishmania* possuem ciclo de vida heteroxênico, ocorrendo sob duas formas evolutivas: amastigota e promastigota. A forma amastigota não possui flagelo externo e é encontrada no interior do vacúolo parasitóforo de macrófagos (GONTIJO; CARVALHO, 2003). No interior de flebotomíneos fêmeas, durante o repasto sanguíneo, podem ingerir as formas amastigotas de um mamífero infectado. No interior do inseto ocorre uma transformação para a forma promastigota procíclica, sendo que, após um período de divisão, as formas denominadas promastigotas metacíclicas, extracelulares e flageladas, instalam-se no intestino anterior do inseto, permitindo a transmissão do protozoário para um novo hospedeiro durante novo repasto sanguíneo (CONCEIÇÃO-SILVA, 2014; SACKS et al., 2002).

Figura 1- Taxonomia de Leishmania

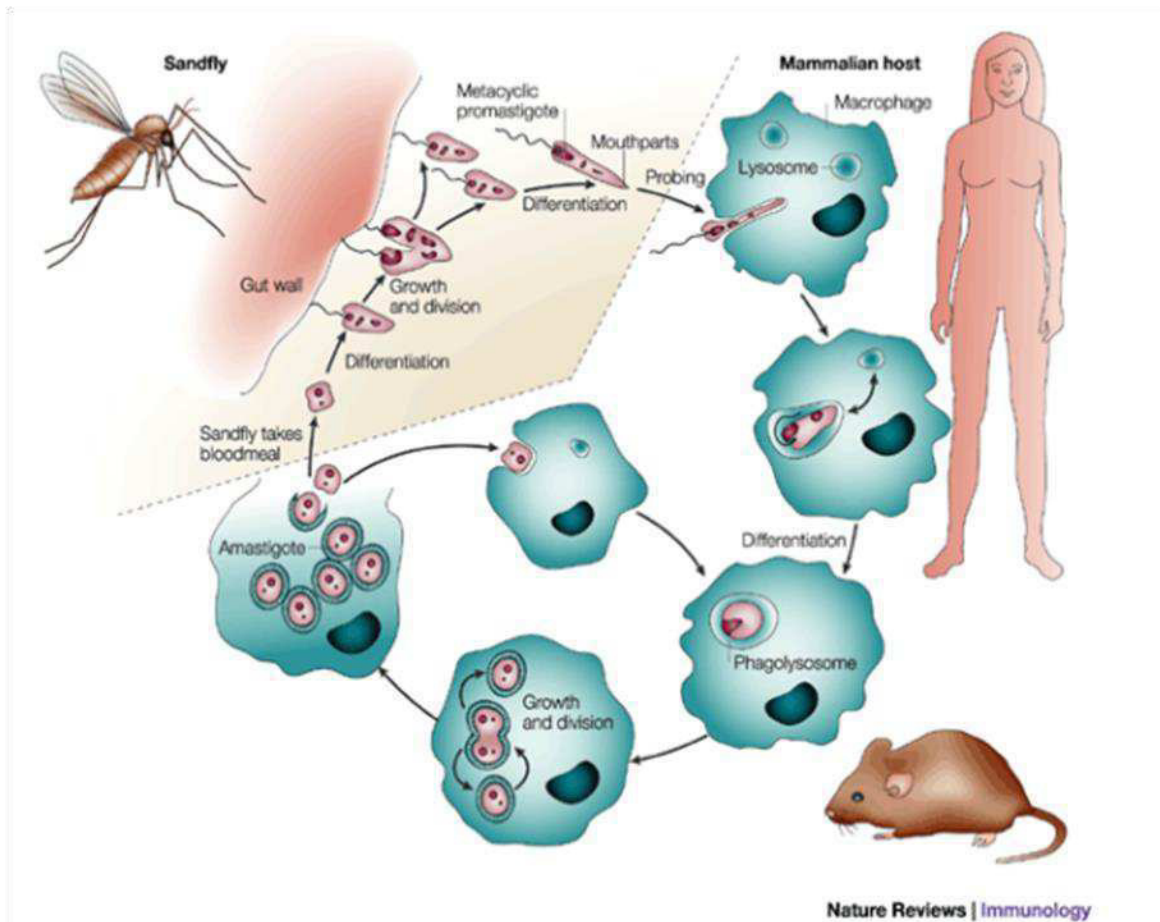


Fonte: OMS 2010.

Insetos do gênero *Phlebotomus* são responsáveis pela transmissão da doença no Velho Mundo, e aqueles do gênero *Lutzomyia* são os vetores nas Américas (LIMA; DEKREY;

TITUS, 1999). A infecção ocorre quando, durante os hábitos hematófagos do inseto, as formas infectantes do parasito, de 1 a 1000 metacíclicas, são liberadas na derme do hospedeiro mamífero (Figura 2) (ALMEIDA; BARRAL; BARRAL-NETO, 2003). Em seguida, os parasitos são rapidamente interiorizados por células do sistema fagocítico mononuclear. No interior dos macrófagos, após a formação dos fagolisossomos, as formas promastigotas se diferenciam na forma amastigota. Estas, por sua vez, multiplicam-se por divisão binária e podem infectar outros tecidos. O ciclo é concluído quando o flebotomíneo torna a se alimentar de hospedeiros infectados, adquirindo as formas amastigotas (CECÍLIO et al., 2014).

**Figura 2- Ciclo de vida de *Leishmania spp.***



Fonte: Extraído de [www.nature.com/.../v2/n11/fig\\_tab/nri933\\_F1.html](http://www.nature.com/.../v2/n11/fig_tab/nri933_F1.html)



---

### 2.1.2 FORMAS CLÍNICAS

---

A doença pode se apresentar sob um amplo espectro de formas clínicas, que variam desde uma infecção assintomática a formas tegumentares (cutânea, difusa e/ou mucosa) ou viscerais (ROBERTS, 2005). As manifestações clínicas da leishmaniose dependem de interações complexas que abrangem parasito e hospedeiro, tais como, espécie, cepa, forma evolutiva, número inicial, e no hospedeiro, mecanismos imunes inatos e adaptativos (PEARSON; SOUSA, 1996; CONCEIÇÃO-SILVA, 2014).

Nas Américas, a forma visceral é causada pela espécie *Leishmania infantum*, que pode ser encontrado sob o uso das denominações *L. chagasi*, e *L. infantum chagasi* como sinonímia. E na forma tegumentar, são relatadas pelo menos 16 espécies diferentes. No Brasil, as espécies causadoras da LTA são *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e *L. braziliensis*. Dentre essas, *L. braziliensis* possui ampla distribuição do sul do Pará ao Nordeste, atingindo o Centro sul do país e algumas áreas da Amazônia. É a espécie mais frequentemente encontrada em todo o território nacional (BRASIL, 2010).

A Leishmaniose Visceral (LV), também conhecida como calazar, é a forma mais grave da doença, e apresenta alta letalidade, quando não tratada adequadamente. Os pacientes com LV podem apresentar febre prolongada, hepatoesplenomegalia, leucopenia, hipergamaglobulinemia, perda de peso e se não tratados, evoluem para um quadro de caquexia (BRASIL, 2014).

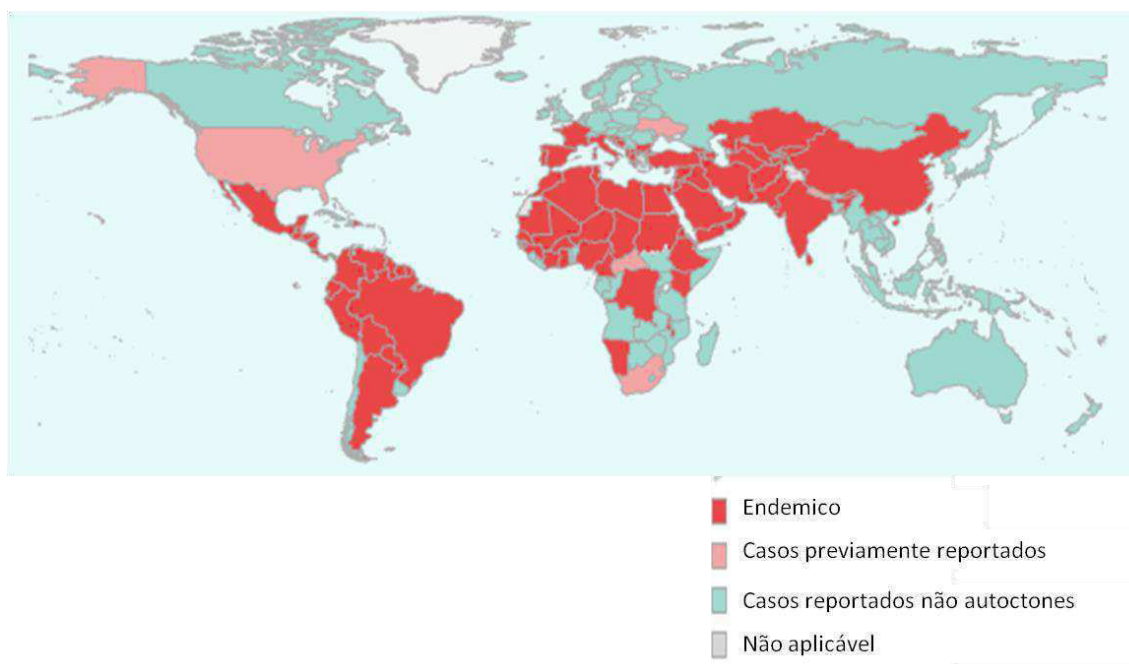
A LTA pode manifestar-se como leishmaniose cutânea localizada (LCL), leishmaniose mucosa (LM) e leishmaniose cutânea difusa (LCD). A LCL é caracterizada por lesões isoladas no local da picada do inseto vetor e pela formação de úlceras com bordas elevadas, fundo plano e superfície granulosa, geralmente autolimitada. A LM apresenta destruição tecidual progressiva associada com intensa resposta inflamatória que levam à destruição de tecido epitelial, principalmente das narinas e da cavidade oral (OMS, 2015). De forma mais rara, lesões nas mucosas podem surgir, quando há úlcera cutânea. Nestas circunstâncias, ela passa a ser denominada de leishmaniose mucocutânea (LMC). Parte dos pacientes com lesões cutâneas iniciais não fazem tratamento ou o fazem inadequadamente. Curas espontâneas ou tratamentos curtos e irregulares constituem um forte risco para o aparecimento da forma mucocutânea (BRASIL, 2010). A leishmaniose cutânea difusa (LCD) caracteriza-se por não

apresentar lesões ulceradas. Sua lesão primária é uma pápula, de onde irão se desenvolver lesões satélites que se disseminarão em nódulos, principalmente na face e nas extremidades. Sua evolução pode perdurar por toda a vida do paciente (PEARSON; SOUSA; JERONIMO, 2000).

### 2.1.3 EPIDEMIOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR

A LT constitui um problema de saúde pública em 98 países com registro de 1 a 1,5 milhões de casos por ano (Figura 3). É considerada pela OMS como uma das seis mais importantes doenças infecciosas, devido ao seu alto coeficiente de detecção e capacidade de produzir deformidades (LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014; OMS, 2015).

Figura 3- Situação da endemicidade de leishmaniose cutânea no mundo.



Fonte: Extraído de OMS 2015.

Estima-se a ocorrência de 0.7-1.2 milhões de novos casos por ano, principalmente no litoral do Mediterrâneo, nas Américas e Ásia (PACE, 2014). Na América especificamente, de 2001 a 2014, foram notificados à PAHO/OMS um total de 797.849 novos casos de leishmaniose cutânea e mucosa, com uma média anual de 56.989 casos, distribuídos em 17 dos 18 países endêmicos das Américas (PAHO, 2016).

No Brasil, a partir da década de 80, a LTA foi diagnosticada em 19 estados, tendo se verificado um crescimento tanto no número de casos de LTA registrados quanto na sua expansão geográfica. Desde 2003, foram confirmados casos de LTA em todos os estados brasileiros (BRASIL, 2011). A epidemiologia da leishmaniose possui dois perfis, ou seja, o de surtos epidêmicos associados ao desmatamento para construção de estradas e exploração de recursos para a expansão da agricultura, e o de ocorrência de casos em áreas da periferia de centros urbanos (BRASIL, 2010). Alguns estudos relatam que a infecção do homem pelo parasito no ambiente peridomiciliar vem aumentando. Isso ocorre devido à adaptação do vetor a ambientes cada vez mais próximos às moradias em consequência das mudanças no meio ambiente provocadas pelo homem (AMPUERO, 2006).

Segundo dados da Organização Mundial de Saúde (OMS), no período de 2000 a 2015, o Brasil apresentou, em média, 21.645 casos de LTA por ano e somente no ano de 2015, 19.395 casos (OMS 2016), sendo que a Região Nordeste notificou 8.076 destes casos (BRASIL, 2014). O estado do Ceará é um dos estados do Nordeste onde mais ocorre a doença com 1.431 casos por ano. Elevados números de casos surgiram na região do Cariri Cearense, com registros de casos de óbitos nos últimos anos (SILVA, 2009; OLIVEIRA, 2014).

---

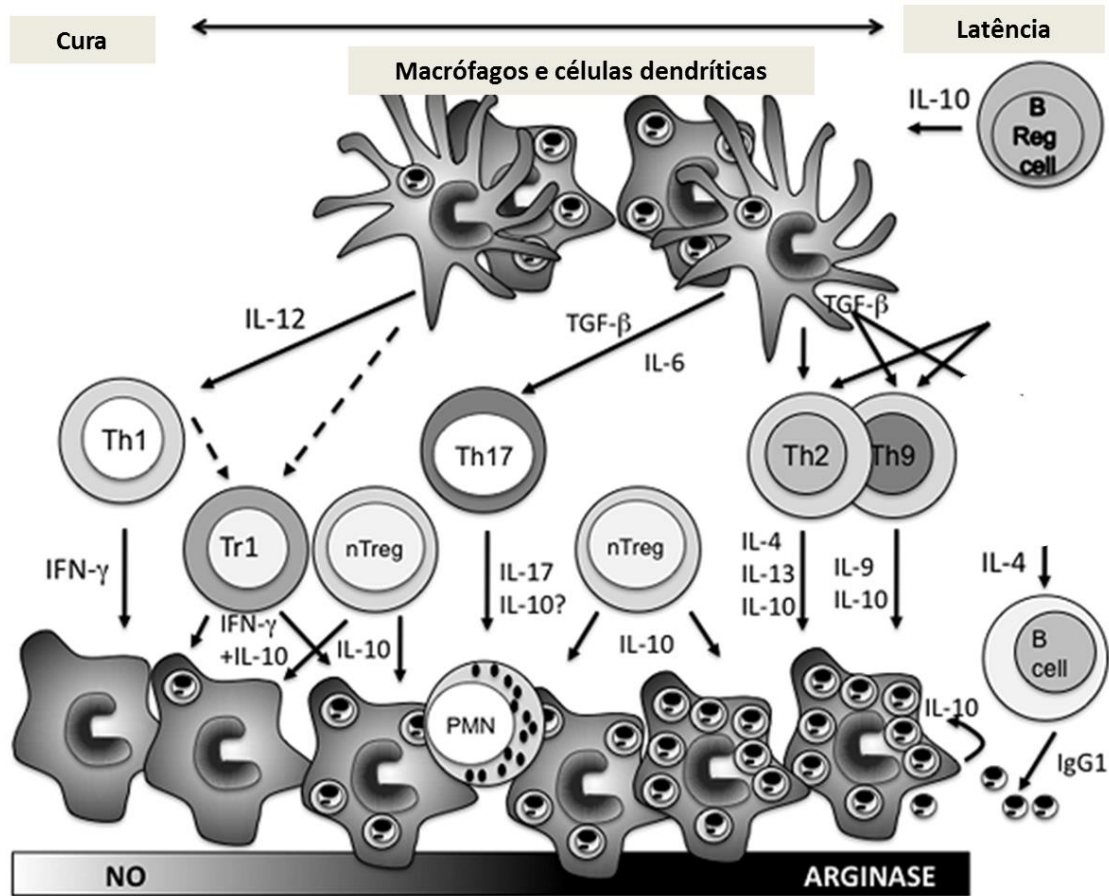
#### **2.1.4 IMUNOLOGIA DA LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA**

---

Os fatores que interferem no estabelecimento e evolução da infecção podem ser dos mais variados, sendo que ainda não é possível traçar um perfil completo de relação de causa e efeito entre o tipo de parasito, a resposta imune do hospedeiro e a apresentação clínica da LTA.

Após infecção do ser humano com *Leishmania*, através da picada pelo flebotomíneo, as formas promastigotas recém-inoculadas na derme do hospedeiro são rapidamente ingeridas por macrófagos, células dendríticas imaturas e neutrófilos, sendo que o sistema imune do hospedeiro procura eliminar o agente infeccioso inicialmente através da imunidade inata (Figura 4).

Figura 4- Mecanismos que influenciam a expansão de diferentes células T CD4<sup>+</sup> como parte da resposta imunológica adaptativa à infecção por *Leishmania spp.*



Fonte: adaptado de Alexander & Brombacher, 2012.

Os neutrófilos fornecem a primeira linha de defesa, liberam mediadores que alteram o ambiente extracelular e recrutam células inflamatórias (RIBEIRO-GOMES et al., 2004). Sua atividade está ligada ao processo de fagocitose, seguida de morte celular programada (CECÍLIO et al., 2014). Estes, por sua vez, são englobados por macrófagos, que além de estimular a resposta imunológica, promovem um ambiente que favorece o estabelecimento da infecção (DA SILVA SANTOS; BRODSKYN, 2014).

Outro grupo do sistema imunológico inato que atua nos eventos iniciais após a infecção, são os componentes do sistema complemento, C3a e C5a, que agem como quimioatraentes para células inflamatórias, como monócitos/macrófagos e neutrófilos. C3b possui função de opsonização das formas metacíclicas. Há ainda a formação do complexo de ataque à membrana (C5b-C9), culminando na morte do parasito nos primeiros minutos pós-

infecção. Parasitos de *Leishmania*, no entanto, possuem mecanismos de evasão, tais como a de inibição da lise pelo sistema complemento (VON STEBUT, 2007).

O controle de inúmeros patógenos, incluindo infecções por protozoários, vírus, bactérias, fungos e helmintos, depende também da produção de espécies reativas de oxigênio (ROIs) e de óxido nítrico (NO), de defensinas e de enzimas hidrolíticas pelos fagócitos (QADOUMI et al., 2002; DA SILVA SANTOS; BRODSKYN, 2014; SACKS; SHER, 2002). A maior fonte de intermediários ROIs ocorre através da ação da enzima nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH), que catalisa a transferência de elétrons, a partir de NADPH, para moléculas de oxigênio, resultando na produção de superóxidos e peróxidos de hidrogênio, sendo fundamental nesse processo a atividade das proteínas cinase C (PKC) e tirosina cinase (PTKs), uma vez que a inibição dessas proteínas suprime a explosão oxidativa em macrófagos (SACKS; SHER, 2002).

Os macrófagos, que já se encontram parasitados, fazem parte do grupo de células apresentadoras de antígenos (APCs), que juntamente com células dendríticas e células B promovem a resposta celular adaptativa mediada por linfócitos T. Porém, para uma resposta efetora bem sucedida, são necessários dois eventos cruciais: a apresentação e o reconhecimento do antígeno. Após a apresentação através das APCs, ocorre o reconhecimento dos peptídeos através do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) via MHC II para o receptor de células T CD4+, seguido da expressão de co-estimuladores como CD40-CD40L, CD80/CD86-CD28, gerando subpopulações T CD4+ Th1, Th2, Th17, Th9 de acordo com as citocinas às quais os linfócitos são expostos (MOSMANN et al., 1986; ALEXANDER; BRYSON, 2005; TULADHAR; NATARAJAN; SATOSKAR, 2011; ABBAS et al., 2015).

Se a resposta for do tipo Th1, citocinas como IL-2, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  serão produzidas, ativando os macrófagos, podendo levar à destruição dos parasitos. Mas, se a resposta for do tipo Th2 serão produzidos IL-4 e IL-10, que inibem a ativação macrofágica. Na leishmaniose cutânea, há predominância da resposta Th1, no entanto, a *Leishmania* é capaz de direcionar a diferenciação de células T para uma resposta do tipo Th2, o que favorece a persistência da infecção (BOGDAN et al., 1996; SCHNORR et al., 2012).

Na diferenciação da resposta Th1, *Leishmania* liga-se a receptores do tipo *Toll-like* (TLR) em macrófagos e células dendríticas, ativando a secreção de IL-12. Ocorre transcrição do fator STAT-4, promovendo a diferenciação das células T em Th1. A interleucina 12 exerce papel fundamental para tal diferenciação, sendo essencial para a ativação dos linfócitos

T. Uma vez ativados, estes secretam IFN- $\gamma$ , que causa ativação clássica dos macrófagos (OLIVIER; GREGORY; FORGET, 2005; TRIPATHI; SINGH; NAIK, 2007).

A resposta imune celular do tipo Th1, através da secreção de IL-2, IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , é importante para a eliminação do parasito, mas pode gerar uma intensa reação inflamatória que pode estar associada com lesão tecidual, tanto na forma cutânea (LC) como na forma mucosa (LM) da leishmaniose (CARVALHO et al., 1994). Na ausência da ativação de células Th1, a produção de IFN- $\gamma$  é baixa ou ausente e, assim sendo, os macrófagos não conseguem eliminar as leishmanias. Nesse aspecto, podem ser observadas formas metastáticas da doença visceral, cutânea difusa e disseminada (CARVALHO et al., 1994; BOMFIM et al., 2007). Estudos relatam também que IFN- $\gamma$  pode ativar macrófagos ou em sinergia com TNF, porém, a produção de NO *in vivo* por macrófagos pode ocorrer de maneira independente de TNF (AGUILAR-TORRENTERA; CARLIER, 2001).

A resposta Th2 é caracterizada principalmente pela produção de IL-4. Esta citocina é produzida por mastócitos, linfócitos NKT, macrófagos alternativamente ativados, linfócitos Th2, induz diferenciação de células T CD4+ para o perfil Th2, que, por sua vez, colabora com a progressão da doença. Estão envolvidas também no processo, IL-10, TGF- $\beta$  e IL-13. IL-10 é secretada por macrófagos, células dendríticas e linfócitos T reguladores. É responsável pela indução de anergia no macrófago, inibição da produção de citocinas por células Th1 e NK (SACKS et al., 2002; AWASTHI; MATHUR; SAHA, 2004). TGF- $\beta$  induz retardo na expressão de iNOS e a produção de IFN- $\gamma$  pelas células NK (LAOUAR et al., 2005).

O perfil Th2, no entanto, pode estar convivendo em maior ou menor equilíbrio, segundo certos modelos de doenças ou condições experimentais, com o perfil Th1 (ALEXANDER et al., 2000; BIEDERMANN et al., 2001; STAGER et al., 2003a,b; MURRAY et al., 2006).

Outras citocinas podem induzir o perfil Th2, de modo independente de IL-4 (MOHRS et al., 2000). Uma via alternativa para ativação de resposta Th2 seria a presença de IL-13, que em modelos murinos de leishmaniose cutânea parece ter papel importante na manutenção da doença e susceptibilidade a infecções por *L. major* e *L. mexicana* (MATTHEWS, et al., 2000; SOSA et al., 2001; ALEXANDER et al., 2002). Na infecção humana por *L. braziliensis*, apesar da produção de IL-4 em resposta ao antígeno de *Leishmania*, IL-13 parece ser a citocina Th2 predominante (PIRMEZ et al., 1993; BOURREAU, et al., 2001a; BOURREAU et al., 2001b; BOMFIM et al., 2007). Na infecção por *L. panamensis*, a resposta imunológica

de camundongos BALB/c se assemelha a de humanos, havendo produção de IL-10, IL-13, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , principalmente, e baixa ou ausente produção de IL-4 (CASTILHO et al., 2010).

As células T reguladoras possuem como principal papel a homeostase e limitação de inflamação excessiva, via produção de IL-10 em particular (PETERSON, 2012). Entretanto, o papel destas células na infecção por *Leishmania* pode ser de promoção ou controle da doença, de acordo com o modelo experimental a ser investigado. Em modelo de infecção de camundongos C57BL/6 resistentes por *L. major*, células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> se acumulam nas lesões e em linfonodos de drenagem, são responsáveis pela persistência de parasitos dependente de IL-10 e pela infecção latente. Ao contrário, em camundongos BALB/c, susceptíveis, células Treg CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> podem desempenhar papel significativo no controle da doença, através da regulação de resposta Th2. A presença de células CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> expressando marcadores regulatórios tais como Foxp3, GITR, e CD103 foi descrita em infecção de camundongos BALB/c por *L. braziliensis*, onde se observou que a presença de T regs CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> Foxp3<sup>+</sup> não interfere na imunidade a reinfecções (FALCÃO et al., 2012).

As células Th17 também exercem importante papel em infecções por *Leishmania*, atuando na migração, recrutamento e ativação de neutrófilos. Seu desenvolvimento ocorre a partir da influência de TGF- $\beta$  e IL-6 e/ou IL-21, sendo caracterizadas pela produção de IL-17 e secreção de IL-21 e IL-22 (KORN et al., 2009). Evidências sugerem que a infecção crônica de *L. amazonensis* está associada à indução de células T CD4<sup>+</sup> produtoras de altos níveis de Th17 (VARGAS & XIN, 2009), levando a atual compreensão de que esse tipo celular desempenha papel exacerbador na leishmaniose cutânea (ALEXANDER & BROMBACHER, 2012).

---

## 2.1.5 MODELOS EXPERIMENTAIS DE LEISHMANIOSE TEGUMENTAR AMERICANA POR *L. braziliensis*

---

Modelos experimentais para Leishmaniose tegumentar têm sido largamente utilizados nos últimos 40 anos para elucidar tipos celulares e sua produção de citocinas (LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014).

### 2.1.5.1 Modelo de infecção em camundongos

---

Os camundongos são os modelos mamíferos mais utilizados para o estudo de doenças infecciosas. Seu porte pequeno, facilidade de se reproduzir em cativeiro, amabilidade, são algumas características que os tornam modelos muito utilizados. Além disso, o projeto genoma em camundongo revelou uma grande similaridade entre o genoma desse animal e o do homem (LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014).

O fenótipo da doença pode ser reproduzido em laboratório, com a utilização de camundongos BALB/c, devido ao fato de serem animais geneticamente susceptíveis à infecção pela forma cutânea da leishmaniose, e podem apresentar progressão da lesão com elevada carga parasitária no local de inoculação (KANE; MOSSER, 2001).

Fatores como tamanho do inóculo, local da infecção e espécie do parasito são importantes para definir o fenótipo da doença (BALDWIN et al., 2003). A infecção com *L. major*, espécie causadora de LT no Velho Mundo, define claramente dois tipos de respostas. Em um deles, animais BALB/c apresentam maior susceptibilidade à doença, devido à produção de citocinas relacionadas com a resposta do perfil Th2, tais como IL-4, IL-13 e IL-9 (LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014). Por outro lado, camundongos C57BL/6 apresentam resistência natural, através da produção de citocinas do perfil Th1, tais como, a produção de IFN- $\gamma$ , ativação de macrófagos, com geração de NO e morte do parasito (AFONSO; SCOTT, 1993; KÉBAIER et al., 2001; MAILLARD et al., 2001; BALDWIN et al., 2003).

A diferenciação das respostas Th1 e Th2 nas leishmanioses é dependente da espécie de *Leishmania* e da linhagem de camundongos. Por exemplo, camundongos C3H/HeN infectados por *L. mexicana* ou C57BL/6, por *L. amazonensis*, evoluem para a forma crônica da doença, enquanto que quando estes últimos são infectados por *L. major*, eles conseguem se curar (AFONSO; SCOTT, 1993).

No modelo de infecção intradérmica na orelha de camundongos BALB/c por *L. braziliensis*, os animais desenvolvem lesões ulceradas com cura espontânea, tendo sido observada uma resposta imunológica mista de perfis Th1/Th2, caracterizadas pela presença de células secretoras de IFN- $\gamma$  e de IL-4 e IL-10 (DE MOURA et al., 2005).



Há um menor número de estudos realizados com modelos animais para *L. braziliensis*, quando comparado com estudos realizados com as demais espécies. Isso pode ser devido ao fato de que o parasito não é facilmente cultivado *in vitro* e devido ao fato das formas promastigotas metacíclicas *in vitro* serem pouco eficientes em sua capacidade de infecção, o que torna necessário o uso de grandes inóculos, em torno de  $10^6$  ou  $10^7$  parasitos (LIMA; DEKREY; TITUS, 1999). Além disso, a maioria das linhagens de camundongos é resistente à infecção por *L. braziliensis* (NEAL & HALE, 1983; CHILDS et al., 1984).

A infecção por *L. braziliensis* não parece levar ao desenvolvimento de uma resposta tipo Th2 em camundongos BALB/c (DEKREY; LIMA; TITUS, 1998), ao contrário do que ocorre na infecção por *L. major*. Trabalhos mais recentes têm demonstrado a relação entre controle e susceptibilidade ao parasito, atribuída às citocinas IFN- $\gamma$  e IL-4, respectivamente, nesses modelos. O tratamento com anti-IFN- $\gamma$  em camundongos C57BL/6 infectados por *L. braziliensis* leva à formação de lesões rápidas e progressivas, comprovando que a presença desta citocina é essencial no controle da infecção (ROCHA et al., 2007; BOGDAN, 2007). Existem outras citocinas envolvidas na infecção de BALB/c por *L. braziliensis*. A infecção leva à indução de produção IL-12 por macrófagos (BORGES, 2001), que por sua vez, direciona o perfil Th1 a produzir IFN- $\gamma$ , que pode estar relacionada ao controle do parasito, visto que *L. braziliensis* induz apenas lesões pequenas e transitórias em camundongos BALB/c. TNF- $\alpha$  também contribui para o controle do parasito durante a fase aguda da infecção, fato observado em camundongos com deleção do gene para esta citocina infectados por *L. brazilliensis*. Observou-se nesses animais um elevado número de parasitos nas lesões, linfonodos e baço (ROCHA et al., 2007).

A infecção em camundongos BALB/c apresentam lesões autolimitadas, com desenvolvimento de lesões pequenas e não ulceradas, quando os parasitos foram inoculados na pata; todavia, encontravam-se ulceradas, quando a infecção foi realizada na derme da orelha (DE MOURA et al., 2005). Apesar de um maior número de estudos utilizando modelos de inoculação dos parasitos na pata dos animais, há autores que utilizam modelo de infecção na derme da orelha com *L. braziliensis* em camundongos BALB/c, visto que conseguem apresentar lesões cutâneas ulceradas no local da inoculação (NOVAIS et al., 2009).

### 2.1.5.2 Modelo de Infecção em Hamster

---

O hamster é um modelo animal bastante empregado para testagem de materiais biológicos suspeitos. Desde 1970, tem sido utilizado como modelo de infecção por *L. donovani* dada sua alta susceptibilidade à infecção e à sua capacidade em manifestar a maioria das alterações patológicas observadas em humanos (ROJAS & SCORSA 1995, RIÇA-CAPELA et al., 2003).

A maioria dos estudos experimentais de *Leishmania* em hamsters utiliza as espécies responsáveis pela forma visceral da doença (*L. donovani* e *L. infantum*). O hamster é considerado o modelo ideal para a LV (MELBY et al., 2001; DEA-AYUELA et al., 2007). Esses estudos abrangem desde a imunopatogênese do modelo na forma visceral da doença (MELBY et al., 1998), até testes de eficácia de medicamentos (DEA-AYUELA et al., 2007, GUPTA et al., 2011).

O hamster provou ser um modelo apropriado para estudos da LTA, uma vez que reproduz a metástase e a linfadenopatia observada em humanos, devido à natureza crônica da infecção. Há disseminação dos parasitos, podendo resultar em lesões distantes do local de inoculação (TRAVI et al., 2002).

A resposta imune frente à infecção por *Leishmania* em hamsters é pouco conhecida (GARG & DUBE 2006). A avaliação da resposta imune celular em células mononucleares de sangue periférico de hamsters infectados com *L. braziliensis* mostrou capacidade proliferativa de linfócitos específicos frente a antígenos de *Leishmania*, correlacionado negativamente com o aumento da pata (GOMES-SILVA et al., 2013). A resposta imune humoral na leishmaniose tegumentar em hamsters é caracterizada pelo aumento nos níveis de imunoglobulina G (IgG) anti-*Leishmania*, e apresenta correlação positiva com o tamanho da lesão e conseqüentemente, com a gravidade da doença (GOMES-SILVA et al., 2013).

Em um estudo em modelo de hamster infectados com *L. panamensis*, foi observada alta expressão de IFN- $\gamma$ , IL-12, IL-10 e TGF- $\beta$  em lesões crônicas com dois meses de evolução, sem um padrão de polarização para o tipo Th1 ou Th2 de resposta (OSORIO et al., 2003). Outro estudo demonstrou também na fase inicial de infecção de hamsters com *L. panamensis* (sete dias de infecção) coexpressão de citocinas do tipo 1 e do tipo 2,

caracterizada por alta expressão de IFN- $\gamma$  e IL-12p40, assim como de IL-4, IL-10, IL-13 e IL-21, o mesmo observado na leishmaniose visceral (ESPITIA et al., 2010).

---

### **2.1.6 TRATAMENTO**

---

Desde o início do século XX, a Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a administração de antimonial para o tratamento das leishmanioses. No entanto, distintas orientações terapêuticas existem em diferentes países e regiões do mundo, o que demonstra a complexidade da abordagem terapêutica nas leishmanioses. No Brasil, até 2014, o protocolo de medicamentos de primeira escolha no tratamento das leishmanioses era os antimoniais pentavalentes. Há dois tipos de antimoniais pentavalentes que são utilizados, ou seja, o antimoniato de N-metilglucamina (Glucantime®) e o estibogluconato de sódio (Pentostan®), sendo que este último não é comercializado no Brasil (BRASIL, 2014).

Os antimoniais pentavalentes possuem eficácia em torno de 85% (AREVALO et al., 2007) e algumas vantagens, como a rápida eliminação renal e limitada acumulação nos tecidos (BLUM et al., 2004). A administração é parenteral, por 20-30 dias, havendo diferenças em taxas de cura. Tal variação pode estar associada com fatores relacionados ao hospedeiro e às características do parasito (LLANOS-CUENTAS et al., 2008).

O uso continuado de antimoniais pentavalentes apresentam várias inconveniências que incluem dor no local da injeção, artralgias e mialgias, toxicidade cardíaca, pancreatite, e em alguns casos, insuficiência hepática e renal. Estes medicamentos também requerem tratamento prolongado e custo elevado (OLIVEIRA et al., 2011). Verifica-se, com frequência, o abandono do tratamento, ou uso de subdosagens, o que tem levado a casos de resistência ao tratamento em alguns pacientes (BLUM et al., 2004; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006).

Os antimoniais pentavalentes possuem ação contra as amastigotas intracelulares, interferindo na bioenergética do parasito, pois inibem tanto a glicólise quanto a oxidação dos ácidos graxos, acompanhada da redução na produção de ATP e GTP (SOUZA et al., 2010; BRASIL, 2014). Para que isso ocorra, a conversão da forma pentavalente em trivalente parece ser importante.

Quando os antimoniais não são efetivos, outras medicações usadas incluem pentamidina, cujos estudos iniciais apontaram eficácia semelhante aos antimoniais. A anfotericina B (desoxicolato, dispersão coloidal e lipossomal) apresenta excelentes resultados terapêuticos, incluindo nos casos resistentes aos antimoniais, no entanto, são medicações que requerem administração injetável e supervisão clínica ou hospitalização durante o tratamento devido a possíveis efeitos secundários, além do alto custo (CHAN-BACAB & PEÑA-RODRIGUEZ, 2001).

A resistência aos antimoniais compromete a capacidade de controle da doença (CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). Por exemplo, na Índia, a resistência chega a 60% (SUNDAR, 2010); dessa forma, os índices de cura relatados não atingem 70% (GONZALEZ et al., 2009; OLIVEIRA, 2011).

A resistência aos antimoniais agrava-se em situações de co-infecção com HIV (BRASIL, 2015). Há indícios que a resistência aos antimoniais está correlacionada com a inibição da produção de óxido nítrico (SOUZA et al., 2010).

A falta de um medicamento efetivo, com baixo custo e pouco ou nenhum efeito colateral para o tratamento das leishmanioses tem levado ao aumento no interesse na reavaliação de medicamentos tradicionais da medicina popular como fonte de ação leishmanicida, principalmente para a forma cutânea.

Em uma atualização do esquema terapêutico da Leishmaniose no Brasil, de acordo com a Portaria n° 67, de 19 de novembro de 2015, o uso da Pentoxifilina 400 mg foi ampliado para o tratamento adjuvante da leishmaniose tegumentar mucosa pelo Sistema Único de Saúde-SUS. O medicamento deve ser utilizado em associação ao antimoniato de N-metilglucamina e é indicado como primeira escolha para pacientes com leishmaniose mucosa com idade superior a 12 anos, excetuando: Gestação; lactação; histórico de hemorragia recente; hipersensibilidade à pentoxifilina, a outras metilxantinas ou a algum de seus excipientes; coinfeção pelo HIV; imunossuprimidos; transplantados; insuficiência renal, hepática ou cardíaca. (BRASIL, 2015).

A pentoxifilina, conhecida comercialmente como Tentral® é utilizada e desenvolvida para o tratamento de doença vascular periférica, sendo capaz de agir em diversos tipos celulares, incluindo macrófagos e neutrófilos. Entre as principais ações celulares observadas para esse fármaco, consta a modulação da produção de citocinas, com a inibição da síntese de

TNF- $\alpha$  de IFN- $\gamma$  (LUNA et al., 2011). Estas observações indicam que Pentoxifilina age por estimular alterações nas respostas celulares tipo Th1 e Th2 (DE SÁ OLIVEIRA et al., 2000). Estudos como os de Lessa et al., (2001) e Machado et al., (2007) demonstraram que a associação da Pentoxifilina com antimoniais pentavalentes para tratamento de pacientes com LC e LM, pode levar à cura das lesões em nove de dez pacientes com LM em 90 dias após a terapia, com completa reepitelização do tecido.

## 2.2 PLANTAS MEDICINAIS COMO ALTERNATIVA TERAPÊUTICA

---

A utilização da natureza de produtos para fins terapêuticos é tão antiga quanto a civilização humana. Historicamente, as plantas medicinais têm sido utilizadas como fitoterápicos, assim como na descoberta de novos fármacos.

Com a grande utilização de fármacos sintéticos e o surgimento de resistência microbiana aos fármacos, o uso de plantas medicinais ganhou espaço como tratamento alternativo, principalmente na população de menor poder aquisitivo (MONTANARI & BOLZANI, 2001).

A magnitude da biodiversidade brasileira, não é conhecida precisamente tal à sua complexidade. Estima-se mais de dois milhões de espécies distintas de plantas, animais e microrganismos. O Brasil é o detentor da maior diversidade biológica do mundo, sendo que 67% das espécies vegetais do mundo encontram-se nas florestas tropicais brasileiras, cuja área corresponde a 7% da superfície da terra (BRASIL, 2012).

O conhecimento sobre o uso de plantas medicinais é amplo, havendo tecnologia para expansão de pesquisas na área (BRASIL, 2006). Baseado nisso e fundamentado na Portaria nº 971 de 2006, foi estabelecida a Política Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, aprovada através do decreto N° 5.813. A ANVISA estabeleceu também uma atualização da legislação através da RDC nº 10/2010, cujas diretrizes para o desenvolvimento de ações garantem o acesso seguro e o uso racional de plantas medicinais e fitoterápicos, promovendo o uso sustentável da biodiversidade, o desenvolvimento da cadeia produtiva e da indústria nacional (BRASIL, 2012).

Nessa busca de novas ações para compostos de origem vegetal, dois parâmetros principais são utilizados: a avaliação de informações etnomédicas e *screening* de diversas

espécies de plantas. O primeiro se apresenta mais eficaz por se basear no conhecimento tradicional popular. Numerosos compostos de origem vegetal têm-se mostrado com potenciais atividades antiparasitárias em modelos *in vitro* e *in vivo*. O uso popular tem demonstrado que caule, raízes, folhas, sementes e frutos de diversas plantas apresentam eficiência na cura de diversas enfermidades (MONZOTE et al., 2009).

---

## **2.2.1 PLANTAS COM AÇÃO LEISHMANICIDA**

---

A atividade leishmanicida de extratos de plantas tem sido avaliada através de estudos *in vitro* e *in vivo*, e seus metabólitos ativos pertencem a diversos grupos químicos, tais como, alcaloides, terpenoides, flavonoides. Diferentes tipos de alcalóides como os quinolínicos, os isoquinolínicos e os indólicos têm demonstrado atividade leishmanicida (KLEIN et al., 2009).

Como parte da pesquisa por novos e melhores medicamentos com alta viabilidade e baixa toxicidade, o Programa de Doenças Tropicais da OMS vem considerando a investigação sobre o uso de plantas no tratamento de leishmaniose como essencial e de alta prioridade (OMS, 2011).

### **2.2.1.1 Estudos *in vitro***

---

Estão mencionados na tabela 1, alguns estudos *in vitro* realizados com os mais variados extratos e/ou compostos bioativos de plantas sobre as diferentes espécies de leishmanias.

Tabela 1- Estudos *in vitro* do efeito leishmanicida de plantas medicinais.

Planta	Protozoário <i>Leishmania</i> spp.	Concentração Inibitória (CI50) promastigotas	Concentração Inibitória (CI50) amastigota	Fonte
<i>Aloe vera</i> (Babosa)	<i>L. donovani</i>	<115 µg/mL	3 - 11 µg/mL	DUTTA et al., 2008
<i>Annona muricata</i> (Graviola)	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. donovani</i>	25 µg/mL 25 µg/mL 25 µg/mL	-	OSORIO et al., 2007
<i>Byrsonima crassifolia</i> (Orelha de veado)	<i>L. mexicana</i>	14 µg/mL	-	PERAZA-SÁNCHEZ et al., 2007
<i>Calophyllum caledonicum</i> (Árvore de santa maria)	<i>L. donovani</i> <i>L. amazonenses</i>	5 µg/mL -	- 12,5 µg/mL	BILLO et al., 2005
<i>Conohea scoparioide</i> (Vassourinha do brejo)	<i>L. amazonensis</i> <i>L. braziliensis</i> <i>L. infantum</i> <i>L. panamensis</i>	Muito Ativo Muito Ativo Muito Ativo -	- - - 1,3 µg/mL	WENINGER et al., 2001
<i>Astronium fraxinifolium</i>	<i>L. braziliensis</i>	2.5 mg/mL	-	
<i>Plectranthus amboinicus</i>		2,5% (48h)	-	LIMA et al., 2014
			0.4mg/mL	TEIXEIRA et al., 2001

Fonte: Adaptado de RONDON, 2011.

### 2.2.1.2 Estudos *in vivo*

Os estudos sobre a atividade leishmanicida de plantas *in vivo*, utilizando o modelo BALB/c e o hamster, têm obtido resultados diferentes dos encontrados *in vitro*, em alguns casos. Por exemplo, as frações diclorometano e éter de petróleo de *Peperomia galioides* (canela branca) e seus constituintes ativos difenólicos exibiram propriedades *in vitro*, no entanto, esta atividade não foi observada no estudo *in vivo* utilizando camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* (FOURNET et al., 1996). Na tabela 2 estão relatados alguns estudos que avaliaram o efeito leishmanicida de plantas em modelo experimental *in vivo*.

Tabela 2- Estudos *in vivo* do efeito leishmanicida de plantas medicinais.

Planta	Animal	<i>Leishmania</i> spp	Redução da Carga Parasitária	Composto isolado	Efeito do Composto	Fonte
<i>Dysoxylum binectariferum</i>	Hamster	<i>L. donovani</i>	38 - 69% no baço	Rohitukina	-	LAKSHMI et al., 2007
<i>Aloe vera</i>	Balb/c	<i>L. donovani</i>	>90% no fígado, medula óssea e baço	-	-	DUTTA et al., 2008
<i>Ocimum gratissimum</i> <i>Lippia sidoides</i> <i>Tabebuia</i> spp	Hamster	<i>L. braziliensis</i>	-	Timol Lapachol	-	TEIXEIRA, 1999 TEIXEIRA, 2001
<i>Zanthoxylum chiloperone</i>	Balb/c	<i>L. amazonensis</i>	-	—Canthin-6-one	Reduziu 70% das lesões	FERREIRA et al., 2002
<i>Chenopodium ambrosioides</i>	Balb/c	<i>L. amazonensis</i>	Reduziu o tamanho das lesões	-	-	PATRÍCIO et al., 2008
<i>Astronium fraxinifolium</i>	Hamster	<i>L. braziliensis</i>	Reduziu o tamanho das lesões	-	-	LIMA et al., 2014
<i>Plectranthus amboinicus</i>	BALB/c	<i>L. braziliensis</i>	lesões	-	-	-

Fonte: Adaptado de RONDON, 2011.

### 2.2.1.3 Mecanismos de ação dos componentes derivados de plantas

Alguns estudos *in vitro* e *in vivo* evidenciam ação direta e indireta sobre o parasito, onde ocorre uma ação imunoestimulante. Dentre as diversas plantas com potencial na modulação da resposta imune contra a leishmaniose, é relatada a espécie *Kalanchoe pinnata* com efeito sobre a redução das lesões em camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis*, através do aumento da produção de NO por macrófagos (DA SILVA et al., 1999). Outro estudo demonstrou que o extrato da parte externa de *Aloe vera* aumentou a produção de NO de macrófagos oriundos de Balb/c infectados experimentalmente por *L. donovani* e o efeito citotóxico mostrou um pequeno percentual de células mortas, de 12% e 18% sobre células humanas monocíticas e macrófagos de murinos, respectivamente (DUTTA et al., 2008). *Tabernaemontana catharinensis*, através de fração etanólica rica em alcaloides, demonstrou efeito citotóxico sobre *L. amazonensis*, mas não apresentou citotoxicidade sobre os macrófagos infectados (SOARES et al., 2007). A fração hidroalcoólica de *Stachytarpheta cayennensis* (gervão) apresentou efeito direto sobre promastigotas de *L. braziliensis*



(MOREIRA et al., 2007). O óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* apresentou ação sobre as formas promastigotas e amastigotas de *L. braziliensis*. O extrato etanólico de folhas de *Astronium fraxinifolium* demonstrou ação *in vitro* e *in vivo* em modelo de hamster infectado com *L. braziliensis* (LIMA, 2014).

---

## 2.2.2 *Plectranthus amboinicus*

---

### 2.2.2.1 Considerações botânicas

---

*Plectranthus amboinicus* (Figura 5) pertence à família Lamiaceae, subfamília Nepetoideae e tribo Ocimeae (LUKHOBBA, SIMMONDS, PATON, 2006). Esta família possui diversos gêneros tais como hortelã (*Mentha*), sálvia (*Salvia*), manjerição (*Ocimum*) e *Plectranthus*. Este último contém cerca de 350 espécies e pode ser encontrado na Ásia, África e Austrália (HARLEY & REYNOLDS, 1992).

Figura 5- Classificação botânica de *Plectranthus amboinicus*.

#### Classificação botânica

Reino: Plantae  
Divisão: Magnolophyta  
Classe: Magnoliopsida  
Ordem: Lamiales  
Família: Lamiaceae  
Gênero: *Plectranthus*  
Espécie: *Plectranthus amboinicus*



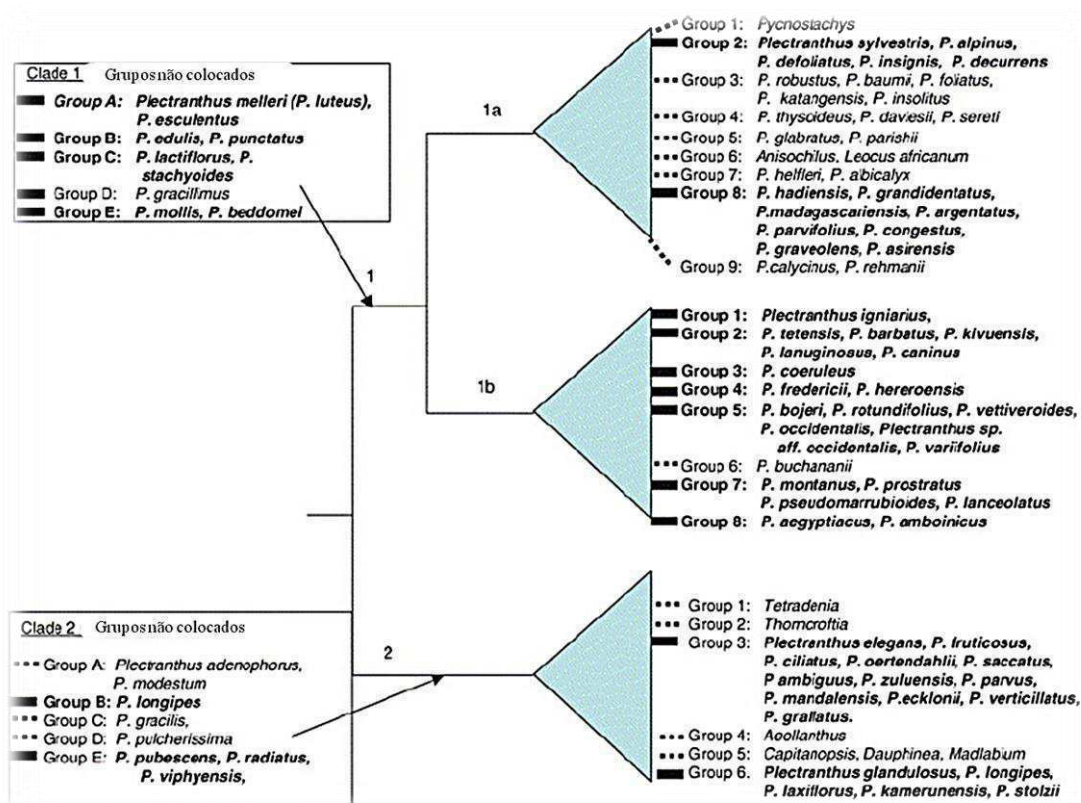
Fonte: Elaborada pelos autores.

O gênero *Plectranthus* apresenta importância econômica por ser bastante utilizado na ornamentação, culinária e medicina (LUKHOBBA, SIMMONDS, & PATON, 2006). As espécies mais utilizadas na medicina tradicional em todo o mundo são *P. amboinicus*,

*P. vetiveroides*, *P. barbatus*, *P. mollis*, *P. coetsa* e *P. incanus*. No estado do Ceará, têm sido principalmente estudadas *P. amboinicus*, *P. barbatus*, *P. ornatus* e *P. grandis*. Estas espécies apresentam capacidade de síntese de uma variedade de metabólitos secundários, como monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos e fenólicos, alguns com propriedades biológicas comprovadas (LUKHOBBA, SIMMONDS, & PATON, 2006).

As 62 espécies de *Plectranthus* foram mapeadas através de estudo filogenético baseado nas sequências de DNA (LUKHOBBA, SIMMONDS, & PATON, 2006). Dois cladogramas foram descritos, sendo que *P. amboinicus* está categorizada no Clado 1, como está ilustrada na Figura 6.

Figura 6- Análise filogenética do gênero *Plectranthus*. As linhas contínuas representam grupos que possuem larga utilização popular e as linhas tracejadas indicam grupos de pouca importância.



Fonte: LUKHOBBA, SIMMONDS, PATON., 2006.

*Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng é uma planta aromática de provável origem indiana, perene, pode atingir até 1m de altura, possui folhas com pecíolos que medem entre 1,5 a 4,5 cm com aspecto carnudo, crenadas e com alto teor mucilaginoso, e apresenta sabor e aromas semelhantes ao orégano. Ela é conhecida popularmente no Brasil como malvariço,

malvarisco, malva, hortelã da folha grande, hortelã grossa e hortelã grande (MATOS et al., 1999).

### 2.2.2.2 Composição química

---

As plantas produzem inúmeros compostos de baixo e alto peso molecular, geralmente classificados como metabolitos primários e secundários. Os metabolitos secundários provenientes das plantas possuem aplicações na medicina, agricultura e indústria além de inúmeras pesquisas a fim de desvendar sua síntese química, biossíntese e bioatividade.

Os metabolitos secundários das plantas podem ser divididos em três grandes categorias: terpenos ou terpenóides, alcalóides e compostos fenólicos (DEVAPPA et al., 2011). Os principais componentes fitoquímicos do gênero *Plectranthus* são diterpenoides, compostos fenólicos e óleos essenciais (ABDEL-MOGIB et al., 2002). Os diterpenos abietanos de *Plectranthus* são compostos antimicrobianos e citotóxicos (TEIXEIRA et al., 1997; GASPAR-MARQUES, 2006).

#### Terpenos

Os terpenos constituem a mais diversificada classe de metabolitos secundários. Formam uma larga família com diversas estruturas derivadas das unidades isoprênicas C<sub>5</sub>. Em sua biossíntese, 3 moléculas de Acetil-CoA formam o ácido mevalônico. O ácido mevalônico sofre descarboxilação e desidratação para formar pirofosfato de isopentila que se condensa com dimetila para dar origem aos monoterpenos, sesquiterpenos, diterpenos, triterpenos e outros terpenos (DEVAPPA et al., 2011).

#### Diterpenos

Os diterpenos, encontrados frequentemente no gênero *Plectranthus*, é o grupo mais estudado de compostos secundários nesse gênero, sendo a maioria abietanos que contêm anéis

fenólicos ou anéis de quinona, além de alguns labdanos, ent-kauranos e seco-kauranos (ABDEL-MOGIB et al., 2002)

O isolamento de diterpenoides é de grande relevância devido ao seu amplo espectro de atividades biológicas, como, por exemplo, os abietanos diterpênicos que possuem atividade antibacteriana, antioxidante e efeitos citotóxicos em linhagens de células tumorais humanas (HANSON, 2005; FIGUEIREDO et al., 2014; TEIXEIRA et al., 1997; RIJO et al., 2009; WELLSOW et al., 2006). Entre os diterpenos com atividade biológica mais conhecida estão: taxol, que possui propriedades anti-tumorais, e a forskolina, que é isolada a partir do *Plectranthus barbatus*, uma das espécies mais estudadas do gênero (Murthy, Ramalakshmi, & Srinivas, 2009; LUKHOB, SIMMONDS, & PATON, 2006).

### **Compostos fenólicos**

Os compostos fenólicos desempenham um papel importante na resistência a doenças e proteção a pragas. Existem dez classes de estruturas químicas diferentes e, entre estas, os flavonoides e os ácidos fenólicos se destacam por serem os compostos mais abundantes encontrados em extratos vegetais (RAMU et al., 2012). Eles possuem atividade antioxidante, anti-aterosclerótico, anti-inflamatório e antitumoral (APROTOSOAIE et al., 2013).

Os principais compostos fenólicos identificados em extratos polares de *Plectranthus* são os ácidos clorogênico, rosmarínico, carnósico e salvianólico. O ácido rosmarínico é um éster de ácido cafeico e ácido 3,4-dihidroxifenil-láctico. A presença deste éster de ácido cafeico e também de outros, tal como a nepetoidina A, permite distinguir esta subfamília. O ácido rosmarínico possui uma grande variedade de interesses biológicos, tais como efeitos antivirais, antibacterianos e antioxidantes (GOMES, 2012; RAMU et al., 2012).

### **Flavonoides**

Os flavonoides são compostos aromáticos de baixo peso molecular que possuem um núcleo flavânico e um esqueleto carbonado com configuração C6-C3-C6. A estrutura básica dos flavonoides consiste em dois anéis de benzeno ligados por um anel pirano que contém oxigênio (MARTENS & MITHÖFER, 2005). Possuem atividade anti-inflamatória, antibacteriana, citotóxica antitumoral, efeitos no tratamento de doenças neurodegenerativas e ação vasodilatadora. Ainda atuam na inibição da peroxidação lipídica, agregação plaquetária e

na atividade enzimática das enzimas ciclooxigenases (COX) e lipoxigenases (LOX) (ASIF & KHODADADI, 2013). A espécie *P. amboinicus* possui uma composição rica em flavonoides como apigenina, crysoeriol, cirsimarítina, luteolina, quercetina, salvigenina, taxifolina (PARRA; RUIZ, 1999; CASTILLO; GONZALEZ, 1999).

### **2.2.2.3 Uso popular e ação farmacológica de *Plectranthus amboinicus***

---

As propriedades terapêuticas de *Plectranthus* podem ser encontradas nas diversas partes da planta (caules, folhas, raízes e tubérculos). *P. amboinicus* e *P. barbatus* (68% do uso medicinal do gênero) são utilizadas em 13 categorias de doenças referidas no *Economic Botany Data Collection Standard* (COOK, 1995). Como exemplos, podem ser mencionadas as doenças respiratórias, de pele, queimaduras, febre, tosse, hemorragias e em infecções bacterianas e virais (RICE, BRITS, POTGIETER, & VAN STADEN, 2011; LUKHOBA, SIMMONDS, & PATON, 2006).

*Plectranthus amboinicus* é utilizada popularmente como antisséptico bucal com ação protetora na mucosa da boca, balsâmico, no tratamento de rouquidão, inflamação da boca e garganta, constipação, cefaleia, tosse, rouquidão, febre, doenças digestivas e ulcerações cutâneas causadas por *L. braziliensis* (LORENZI & MATOS, 2002; MORAIS, DANTAS, SILVA, & MAGALHÃES, 2005). Possui ainda propriedades farmacológicas conhecidas como anticonvulsivante, antiasmática, antiespasmódica, broncodilatador, antimicrobianas, antitumoral e anti-inflamatória. Ela tem sido utilizada principalmente na forma de infusão e de xarope (MATOS, 2000). Há também estudos prévios que revelaram a ação leishmanicida de *P. amboinicus* para as formas promastigotas de *L. chagasi* e *L. amazonensis* (TEMPONE, 2008).

**CAPÍTULO III**

**MATERIAIS E MÉTODOS**

---

### 3.1 COMITÊ DE ÉTICA PARA PESQUISA ANIMAL (CEPA)

---

O projeto para realização da tese foi aprovado pelo Comitê de Ética para Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (CEPA/UFC) em 12 de Dezembro de 2011, através do protocolo 75/ 2011 (Anexo 1).

### 3.2 PREPARAÇÃO DOS EXTRATOS

---

A coleta das folhas de *P. amboinicus* foi realizada no Horto de Plantas Medicinais Francisco José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará (HPM-FJAM/UFC). Uma exsicata está depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará – UFC, sob o registro #40080.

As folhas (8kg) foram secadas, trituradas e submetidas à extração sequencial com hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol, obtendo-se os respectivos extratos cujos rendimentos estão mostrados na Tabela 3.

**Tabela 1** Rendimento dos extratos de *Plectranthus amboinicus* (L) Spreng.

Extrato	Rendimento
Etanol	0,37% (29.44g)
Hexano	0,69% (55.41g)
Diclorometano	0,38% (30.25g)
Acetato de etila	0,06% (5.0g)

Fonte: Elaborada pelos autores.

#### 3.2.1 ANÁLISE FITOQUÍMICA DOS EXTRATOS

---

Os testes fitoquímicos foram realizados de acordo com MATOS (1997), a partir de uma solução hidrofílica (etanol com 30% de água). Sete tubos de ensaio contendo volumes de 3 a 4 mL de suspensão e dois béqueres contendo volumes de 10 mL de suspensão foram deixados em banho-maria até secar e mantidos em dessecador até a realização dos testes. Foram realizados testes para alcaloides, saponinas, Lieberman-Burchard (esteróides e

triterpenóides), flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas, antocianidinas, antocianinas, flavonoides e taninos (MATOS, 1997).

### **3.3. PARASITOS**

---

Cepa de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, LTCP 393, isolada de paciente com leishmaniose cutânea, foi cedida pela Profa. Dra. Maria Jania Teixeira do Departamento de Patologia, Universidade Federal do Ceará. A virulência da cepa foi mantida através de passagem regular em hamster dourado. Após a coleta dos parasitos através de aspiração do linfonodo de drenagem da lesão, os mesmos foram cultivados em meio N.N.N (vide preparo em Apêndice A), contendo meio Schneider (Sigma, USA) suplementado com urina humana, soro bovino fetal (Gibco, USA) (20%), L-glutamina, Penicilina/Estreptomicina por 7 dias a 25°C em estufa do tipo B.O.D. Para garantir a virulência da cepa, só foram utilizados nos experimentos os parasitos obtidos até a 5ª passagem em cultura. Os parasitos foram submetidos a um ciclo de lavagem com salina estéril gelada, com centrifugação a 1.500 rpm, por 15 min a 4°C e ajustados com meio Schneider suplementado para as concentrações desejadas em cada experimento. A viabilidade dos parasitos foi analisada por sua motilidade através da observação em câmara de Neubauer e microscópio óptico no aumento de 40x.

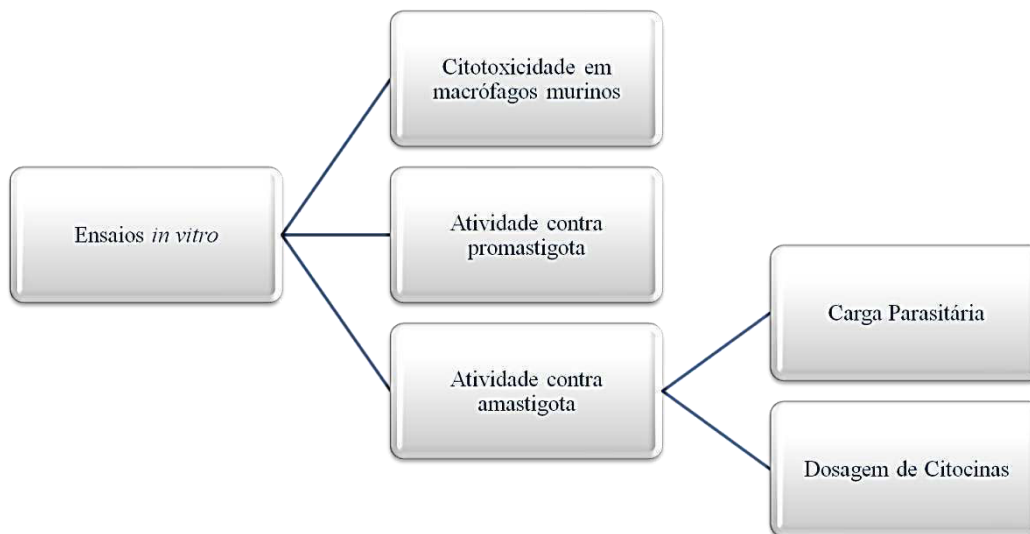
### **3.4 ENSAIOS *IN VITRO***

---

Os ensaios *in vitro* seguiram a sequência demonstrada na Figura 7.



Figura 1- Fluxograma representativo dos ensaios *in vitro* realizados com os extratos de *P. amboinicus* contra *L. (V.) braziliensis*.



Fonte: Elaborada pelos autores.

### 3.4.1. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CONTRA FORMAS PROMASTIGOTAS

A atividade contra formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foi analisada através de cultivo (TEIXEIRA, 1999) em placas de cultura de 48 poços (Costar, USA). Cada poço recebeu 200  $\mu\text{L}$  do meio contendo  $5 \times 10^6$  formas promastigotas de *L. braziliensis*, 200  $\mu\text{L}$  do meio Schneider suplementado e diferentes concentrações dos extratos hexano, diclorometano, acetato de etila ou etanólico de *P. amboinicus* (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 mg/mL). A seguir, as microplacas foram vedadas com filme plástico e incubadas a 34 °C pelos tempos de 24 e 48 h, em estufa tipo B.O.D. (Fanem, Brasil). Foram utilizados os seguintes controles: a) meio Schneider suplementado contendo as formas promastigotas de *L. braziliensis*; b) diluente DMSO 1%; c) Glucantime®, (Sanofi, USA) na concentração de 32 mg/mL. Após incubação, foi retirada uma alíquota de suspensão de células (10  $\mu\text{L}$ ), adicionado formol a 2% (45  $\mu\text{L}$ ) e corante azul de Tripán (Gibco-Laboratories) (45  $\mu\text{L}$ ), para contagem das formas promastigotas em câmara de Neubauer com auxílio de um microscópio óptico com aumento de 40 vezes. Os ensaios foram realizados em sextuplicata e foram repetidos em três experimentos independentes.

---

### 3.4.2. OBTENÇÃO DE MACRÓFAGOS

---

Macrófagos de camundongos albinos *Swiss* (provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará), previamente estimulados com 2 mL de solução de tioglicolato de sódio 3% por via intra-peritoneal (i.p.), foram obtidos por lavagem peritoneal com 10 mL de RPMI contendo heparina (10 UI/mL). As células foram centrifugadas (1.500 rpm, 10 min a 4°C), lavadas com salina a 0,9% e ajustadas para a concentração desejada ( $2 \times 10^6$  células/mm<sup>3</sup>) em RPMI contendo soro bovino fetal (SBF), 10% 50 µM de 2-mercaptoetanol, 2 mM L-glutamina, e antibióticos (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina).

---

### 3.4.3. TESTE DE CITOTOXICIDADE

---

Para a realização do teste de análise de citotoxicidade do extrato acetato de etila de *Plectranthus amboinicus* em macrófagos, utilizou-se a coloração das células por azul de Tripán 0,4%. Macrófagos na concentração de  $2 \times 10^6$  células/mm<sup>3</sup> foram cultivados em tubos estéreis de 1 mL (tipo eppendorf) com o extrato acetato de etila de *P. amboinicus* ou com o antimonial Glucantime®, (Sanofi, USA) diluídos em RPMI contendo DMSO 1% nas concentrações de 0,008 a 4 mg/mL. Foram usados dois controles negativos: um apenas com macrófagos e outro com macrófagos e DMSO a 1%. As culturas foram incubadas por 24 horas a 37°C em estufa CO<sub>2</sub>. Após, esse período foram coradas com solução de azul de Tripán 0,4%, sendo a percentagem de células não viáveis determinada, utilizando-se câmara de Neubauer e microscópio óptico em aumento de 40 vezes.. O cálculo das células não viáveis foi feito, aplicando-se a seguinte fórmula: lise celular (%) = número de células não viáveis (coradas) ÷ total de células (coradas e não coradas) x 100. Foram consideradas não citotóxicas concentrações que produziram ≤20% de morte celular (≥80% de células viáveis) (TEIXEIRA, 2001).

---

#### 3.4.4. AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE CONTRA FORMAS AMASTIGOTAS

---

Macrófagos foram cultivados em placas de 24 poços de fundo chato (Falcon®, U.S.A), em sextuplicata, contendo lamínulas circulares de 13mm (Glasscyto®, U.S.A) na concentração de  $10^6$  células/mL em RPMI+SBF e antibióticos, e incubados por um período de 48h a 37°C em estufa (Thermo, U.S.A) contendo 5% de CO<sub>2</sub>. A seguir, as células foram lavadas com RPMI a 37°C. Promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, em fase estacionária de crescimento, foram adicionadas na razão de 10:1 macrófago e as culturas foram incubadas por 24h a 37°C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, as células foram lavadas novamente com RPMI a 37°C. O extrato acetato de etila de *P. amboinicus* foi adicionado em diversas concentrações (0,03-0,25mg/mL em DMSO 0,5%), juntamente aos controles Glucantime (20µg/mL) ou com o veículo de solubilização (DMSO 0,5%). Após 24h de incubação, as células foram lavadas mais uma vez com meio RPMI a 37°C (TEIXEIRA, 1999).

Para quantificar o nível de infecção dos macrófagos, as lamínulas contendo as células foram lavadas com solução salina 0,9% e, em seguida, fixadas e coradas com corante Giemsa (Sigma-Aldrich,USA). As lamínulas coradas foram montadas em lâminas de vidro e examinadas em microscopia óptica com ampliação de 100x com óleo de imersão. Cinquenta células foram examinadas e o número de amastigotas por 50 células foi determinado. A leitura foi feita de maneira que o observador não tivesse conhecimento sobre os controles tampouco sobre os testes.

---

#### 3.4.5 DOSAGEM DE CITOCINAS

---

As produções de IL-4, IL-10, TGF-β e TNF-α nos sobrenadantes obtidos da cultura de macrófagos foram determinadas utilizando-se a técnica imunoenzimática em fase sólida (ELISA), como recomendado pelo fabricante dos kits (BD Biosciences, San José, CA, USA). Resumidamente, placas de 96 poços, fundo chato (Costar, USA) foram sensibilizadas por 12h com os anticorpos de captura anti-citocinas na concentração determinada a 4°C. As placas foram lavadas, utilizando-se solução de lavagem (PBS com Tween 20 a 0,05%), e em seguida

foi realizado bloqueio com tampão fosfato de sódio (PBS), pH 7,4, contendo soro bovino fetal (SBF 10%), seguido de incubação por 1 hora a temperatura ambiente. Após lavagem com PBS- Tween 20 foram adicionados os padrões e as amostras em duplicata e, em seguida, as placas foram incubadas novamente por 2 h ou por uma noite (dependendo da citocina) à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS-Tween 20, as placas foram incubadas por mais 1 h com os conjugados anti-citocinas marcados com peroxidase. Após novas lavagens, uma solução contendo cromógeno e substrato foi adicionada, deixando-se as placas por 30 minutos a temperatura ambiente e protegida da luz. A reação foi finalizada com ácido fosfórico (1:20) e a leitura realizada em leitor de ELISA (Molecular Devices Corp.; Sunnyvale, CA, USA), utilizando filtro de 450nm. Os resultados foram calculados com auxílio do programa Softmax PRO (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

### **3.5. ENSAIOS *IN VIVO***

---

#### **3.5.1 ANIMAIS**

---

Hamsters (*Mesocricetus auratus*), adultos, machos, com idade variando de 8-12 semanas; e camundongos Swiss (*Mus musculus*) e da linhagem BALB/c, machos, com idade entre 6-8 semanas, provenientes do biotério do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) da UFC, foram mantidos a temperatura ambiente, com ração comercial apropriada e água *ad libitum*.

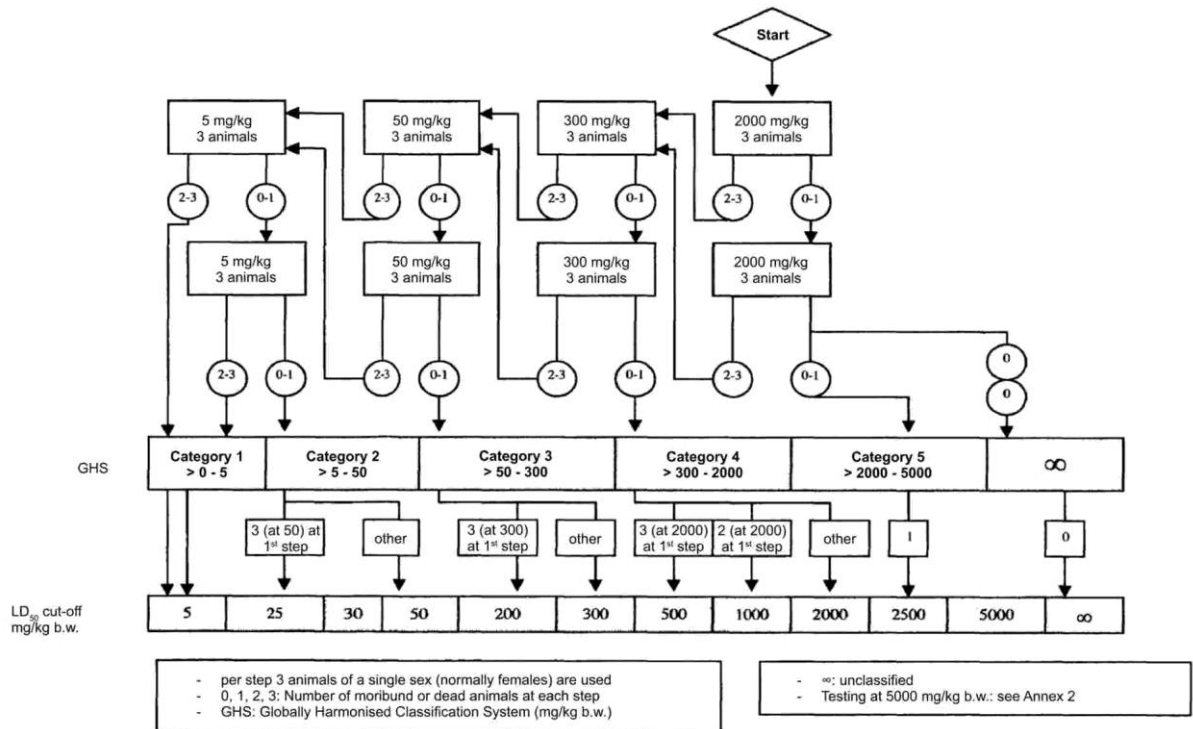
#### **3.5.2 TOXICIDADE AGUDA E DETERMINAÇÃO DA DL<sub>50</sub>**

---

Para avaliar a toxicidade aguda de EAEPA (Figura 2), foi utilizado o extrato na concentração inicial de 2000 mg/kg administrado por via oral (gavagem) em três camundongos previamente mantidos em jejum de três horas e com água a vontade. A mortalidade foi monitorada por 14 dias. Finalizado este período, outros três camundongos receberam mais uma dose do extrato (2000 mg/Kg), que foi escolhida baseada no número de

animais mortos ou não na etapa anterior. Uma vez que a mortalidade foi igual à obtida na etapa anterior, o teste foi finalizado e a  $DL_{50}$  estimada (OECD, 2001).

Figura 2- Esquema do teste de toxicidade aguda



Fonte: OECD 2001.

### 3.5.3. MODELO EXPERIMENTAL DE INFECCÃO

Os hamsters foram infectados no coxim plantar da pata posterior direita com 20  $\mu$ L de promastigotas na fase estacionária, na concentração de  $1 \times 10^6$ . Observou-se o surgimento da lesão, que foi acompanhado a cada 7 dias, utilizando-se um paquímetro de escala circular (Mitutoyo, Japão) por um período de 56 dias, equivalente a 8 semanas de infecção. A espessura da lesão foi representada pela diferença entre a pata direita infectada e a contralateral esquerda não infectada. Após 4 a 5 semanas de infecção, quando as lesões já eram aparentes, os animais foram tratados (TEIXEIRA, 1999).

Os camundongos BALB/c foram infectados na derme da orelha direita com 20  $\mu$ L na concentração de  $1 \times 10^7$  promastigotas (DE MOURA et al., 2005). O tamanho da lesão foi

acompanhado semanalmente por 8 semanas de infecção. A espessura da lesão foi representada pela diferença entre a orelha direita infectada e a contralateral esquerda não infectada. Após 4 a 5 semanas de infecção, quando as lesões já eram aparentes, os animais foram tratados (COSTA et al., 2011).

---

#### **3.5.4. TRATAMENTO**

---

Os animais foram divididos em 04 grupos, contendo 05 animais por grupo. As drogas foram administradas diariamente por 30 dias nos hamsters e 15 dias nos camundongos BALB/c. Utilizou-se uma dose de 4 mg de amostra vegetal/kg, administrada diariamente via intraperitoneal (i.p.) ou via intra-lesional (i.l.), aos hamsters; e 250mg/kg/dia i.p. aos camundongos BALB/c. Um grupo foi tratado apenas com o veículo de solubilização (DMSO 1% v/v), uma vez ao dia, via i.p. A droga padrão Glucantime® foi administrada na dose de 20 mg/kg, via intra-muscular (i.m.). Esta dose correspondeu a 1/25 a da DL 50. Como amostra vegetal, foi utilizado o extrato acetato de etila *P. amboinicus*, uma vez que esta apresentou o melhor desempenho nos testes *in vitro*.

---

#### **3.5.5. AVALIAÇÃO DO EFEITO TERAPÊUTICO DA AMOSTRA VEGETAL**

---

##### **3.5.5.1. Tamanho da lesão**

---

Durante a evolução do tratamento, foram realizadas medidas semanais do tamanho das lesões dos animais, conforme mencionado anteriormente no ítem 3.5.3.

##### **3.5.5.2. Quantificação da carga parasitária no linfonodo regional**

---

A carga parasitária foi quantificada através da técnica de diluição limitante (TITUS et al., 1985), modificada por SILVA et. al. (1994). Após o término do tratamento (30 dias nos

hamsters e 15 dias nos camundongos BALB/c), os animais foram eutanasiados por inalação com halotano e os linfonodos poplíteos de drenagem das lesões e as patas (hamsters) ou orelhas infectadas (camundongos) foram isolados assepticamente, macerados em 1 mL de Schneider e deixados em repouso por 5 minutos. A partir dessa suspensão de células, foram feitas diluições seriadas a 1:10 em meio Schneider suplementado. Cem microlitros destas diluições foram distribuídos em placas de cultura de 96 poços (Nunc, Germany), fundo chato, contendo meio ágar-sangue N.N.N., em sextuplicata (6 poços/diluição). As placas foram vedadas e incubadas por 3 semanas a 26°C. Foram observadas em microscópio óptico invertido (AusJena, Germany) de 3 em 3 dias para o registro das diluições que continham promastigotas. O número final de parasitos foi determinado utilizando-se o programa ELIDA (TASWELL, 1984).

### **3.5.5.3. Análise histopatológica**

---

As orelhas infectadas de 5 animais de cada grupo foram fixadas em formalina tamponada neutra a 10%. Os tecidos foram montados em blocos de parafina, seccionados com espessura de 5 µm, e corados com hematoxilina e eosina para análise histológica. Avaliaram-se os seguintes parâmetros: infiltrados inflamatórios, reações granulomatosas, macrófagos vacuolados e presença de amastigotas. Cada parâmetro foi avaliado de acordo com a intensidade do evento através dos escores: 0 (ausência), 1+ (1-25% presença, raro), 2+ (presença de 25-50%; moderada), 3+ (>50%; intensa). A análise celular foi avaliada em cinco campos, utilizando o aumento de 1000 x.

### **3.5.5.4. Isolamento de RNA e PCR em Tempo Real**

---

A expressão de RNA mensageiro para COX-2, VEGF-a, TNF-α e TGF-β, foi avaliada pela técnica de RT-PCR, realizada no Laboratório de Imunologia do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Ceará. A expressão foi determinada em amostras de linfonodo de drenagem de camundongos BALB/c infectados tratados por 15 dias após a infecção na orelha com 10<sup>7</sup> promastigotas de *L. braziliensis*.

O RNA total foi extraído a partir de amostra de tecido de linfonodos utilizando Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA), conforme as recomendações do fabricante. O RNA total obtido foi dissolvido em água ultrapura tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e mantido a -80 °C até o uso. Aproximadamente 0,5 µg de RNA total foi transcrito reversamente em DNA complementar (cDNA) com auxílio do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, EUA) em volume final de 20µL, seguindo as recomendações do fabricante.

Para o desenho de primers específicos, as sequências de mRNA dos alvos estudados foram obtidas do NCBI e analisadas através do software OligoPerfect™ Designer (Thermo Fisher Scientific, EUA), obtendo-se os seguintes primers: COX-2, F:5'-AGAAGGAAATGGCTGCAGAA-3' e R:5'-GCTCGGCTTCCAGTATTGAG-3'; VEGF-a, F:5'-CCAGGAGGACCTTGTGTGAT-3' e R:5'-GGGAAGGGAAGATGAGGAAG-3'; TNF-α, F:5'-CTGGGACAGTGACCTGGACT-3' e R:5'-GCACCTCAGGGAAGAGTCTG-3'; TGF-β, F:5'-TTGCTTCAGCTCCACAGAGA-3' e R:5'-TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC-3'; β-actina (housekeeping gene), F:5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3' e R:5'-CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA-3'.

As reações foram realizadas em um termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, EUA) e os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 2,5% seguida por revelação com SYBR Safe (Invitrogen, EUA). A intensidade das bandas foi quantificada por análise densitométrica ChemiDoc MP (BIO-RAD, EUA) e Image Lab software (BIO-RAD, EUA).

### **3.6. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

---

Os dados obtidos estão apresentados como média aritmética ± erro padrão (EP). O número de parasitos presentes nas lesões e linfonodos foram determinados pela análise do Qui-quadrado mínimo, aplicada à distribuição de Poisson, utilizando o programa ELIDA (TASWELL, 1984). Os resultados do estudo foram analisados pelo teste-*t* de Student ou análise de variância (ANOVA), seguida por pós-teste de Tukey. Para as comparações entre múltiplos grupos foi realizado o teste one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste Bonferroni. Todas as análises foram realizadas, utilizando-se o programa GraphPad Prism version 7.0



para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Em todos os testes utilizados, a significância mínima foi aceita quando  $p < 0,05$ .

**CAPÍTULO IV**

**ANTIMICROBIAL ACTIVITY OF *PLECTRANTHUS*  
*AMBOINICUS* IN HAMSTERS INFECTED WITH *LEISHMANIA*  
(*VIANNIA*) *BRAZILIENSIS***

**ARTIGO I - SUBMETIDO À PARASITOLOGY RESEARCH**

## Parasitology Research

### Antimicrobial activity of *Plectranthus amboinicus* in hamsters infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis* –Manuscript Draft–

<b>Manuscript Number:</b>	PARE-D-17-00160	
<b>Full Title:</b>	Antimicrobial activity of <i>Plectranthus amboinicus</i> in hamsters infected by <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>	
<b>Article Type:</b>	Original Paper	
<b>Funding Information:</b>	Fundação Cearense de Apoio ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico	Mrs THIALLY Braga GONCALVES
<b>Abstract:</b>	<p>The aim of this study was to evaluate antimicrobial activity of <i>Plectranthus amboinicus</i> (Lour.) Spreng in hamsters infected by <i>Leishmania (Viannia) braziliensis</i>. Hexane, dichloromethane and ethyl acetate extracts from <i>P. amboinicus</i> were firstly tested for in vitro antimicrobial activity against <i>Leishmania</i> promastigotes forms. Once ethyl acetate extract (EAEPA) showed a good activity, it was selected for the in vivo assays. Golden hamsters were infected subcutaneously with 10<sup>6</sup> <i>L. braziliensis</i> promastigotes. Animals were treated by EAEPA at 4 mg/kg via intralesional or intraperitoneal routes for 30 days, after the appearance of lesions. Some parameters were evaluated such as lesion size, parasite load and histopathological analysis on infected footpad. Phytochemical analysis of the EAEPA revealed the presence of flavonol and digitalis glycosides, tannins and steroids. EAEPA administered via intraperitoneal route could efficiently reduce lesion thickness, parasite load, and inflammatory parameters. On the other hand, the animals treated with the standard drug, Glucantime®, showed the best results. The data suggest that <i>Plectranthus amboinicus</i> presents antimicrobial activity against <i>L. braziliensis</i>. Nonetheless, further investigations should be carried out to associate this data with other plants in order to achieve results similar to those obtained with the conventional treatment.</p>	
<b>Corresponding Author:</b>	THIALLY Braga GONCALVES, M.D. Universidade Federal do Ceará Fortaleza, Ceará BRAZIL	
<b>Corresponding Author Secondary Information:</b>		
<b>Corresponding Author's Institution:</b>	Universidade Federal do Ceará	
<b>Corresponding Author's Secondary Institution:</b>		
<b>First Author:</b>	THIALLY Braga GONCALVES,	
<b>First Author Secondary Information:</b>		
<b>Order of Authors:</b>	THIALLY Braga GONCALVES, Milena Aguiar Braga, student Marília Lopes Monteiro, Pharmacist Francisco Rafael Maciano Fonseca, M.D Weberthy Mayk Eufrásio Figueiredo Margarida Maria de Lima Pompeu, P.h.D Glvandete Pinheiro Santiago, P.h.D Maria Jania Teixeira, P.h.D Aparecida Tiemi Nageo-Dias, Ph.D	
<b>Order of Authors Secondary Information:</b>		
<b>Author Comments:</b>	Dear Editor	

**Antimicrobial activity of *Plectranthus amboinicus* in hamsters infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis***

Thially Braga Gonçalves<sup>1,2</sup>; Milena Aguiar Braga<sup>1</sup>; Marília Lopes Monteiro<sup>1</sup>; Francisco Rafael Maciano Fonseca<sup>3</sup>; Weberty Mayk Eufrásio de Figueiredo<sup>3</sup>; Margarida Maria de Lima Pompeu<sup>3</sup>; Gilvandete Pinheiro Santiago<sup>4</sup>; Maria Jânia Teixeira<sup>3</sup>; Aparecida Tiemi Nagao-Dias<sup>1</sup>.

- 1- Department of Clinical and Toxicological Analysis, Faculty of Pharmacy, Dentistry and Nursing. Federal University of Ceara. Fortaleza, Ceará, Brazil.
- 2- University Center Leao Sampaio, UNILEAO, Juazeiro do Norte, CE, Brazil.
- 3- Department of Pathology and Legal Medicine, Faculty of Medicine, Federal University of Ceará. Fortaleza, Ceará, Brazil.
- 4- Department of Pharmacy, Faculty of Pharmacy Dentistry and Nursing. Federal University of Ceara. Fortaleza, Ceará, Brazil.

**Correspondent author:**

**Thially Braga Gonçalves**

**Department of Clinical Analysis and Toxicology**

**Faculty of Pharmacy**

**Universidade Federal do Ceara**

**Rua Capitao Francisco Pedro, 1210**

**CEP 60430-372 Fortaleza, Ceará, Brazil**

**Email: [thially@gmail.com](mailto:thially@gmail.com)**

**ORCID ID: 0000-0002-8484-5275**

**Phone: 55-85-3366 8270**

**Fax: 55-85-3366 8292**

## Abstract

The aim of this study was to evaluate antimicrobial activity of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng in hamsters infected by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. Hexane, dichloromethane and ethyl acetate extracts from *P. amboinicus* were firstly tested for *in vitro* antimicrobial activity against *Leishmania* promastigotes forms. Once ethyl acetate extract (EAEPA) showed a good activity, it was selected for the *in vivo* assays. Golden hamsters were infected subcutaneously with  $10^6$  *L. braziliensis* promastigotes. Animals were treated by EAEPA at 4 mg/kg via intralesional or intraperitoneal routes for 30 days, after the appearance of lesions. Some parameters were evaluated such as lesion size, parasite load and histopathological analysis on infected footpad. Phytochemical analysis of the EAEPA revealed the presence of flavonol and digitalis glycosides, tannins and steroids. EAEPA administered via intraperitoneal route could efficiently reduce lesion thickness, parasite load, and inflammatory parameters. On the other hand, the animals treated with the standard drug, Glucantime®, showed the best results. The data suggest that *Plectranthus amboinicus* presents antimicrobial activity against *L. braziliensis*. Nonetheless, further investigations should be carried out to associate this data with other plants in order to achieve results similar to those obtained with the conventional treatment.

## Keywords

Cutaneous leishmaniasis. *Leishmania braziliensis*. *Plectranthus amboinicus*. Hamster.

## Introduction

Leishmaniasis is a major public health problem and represents a complex disease with important clinical spectrum and epidemiological diversity. The disease is endemic in tropical and subtropical regions, across 98 countries, and affects all continents except Antarctica and Oceania (Desjeaux 2004; Alvar et al. 2012; WHO 2016). According to WHO (2016), 350 million people are at risk of contracting the disease, with an approximate two million new cases per year (Alvar et al. 2012). The chemotherapy of choice is based on pentavalent, antimonial drug sodium, stibogluconate complexed to carbohydrates in the form of sodium, stibogluconate (Pentostan) and meglumine antimoniate (Glucantime). These drugs are highly toxic and may lead to antimicrobial resistance. Moreover, they can accumulate in organs such as spleen and liver, and cause myalgia, pancreatitis, cardiac arrhythmia and hepatitis (Chan-bacab and Peña-Rodríguez 2001; Croft et al. 2006a). Amphotericin B is the second choice for the treatment of cutaneous leishmaniasis in Colombia and against the visceral form of the disease in India (Soto et al. 2004; Sundar and Chakravarty 2010). It also presents a high toxicity, and its high cost is a limiting factor, besides the problem that patients under its use need electrocardiography survey and laboratory monitoring of liver enzymes and renal function (Meheus et al. 2010). Once the drugs available to the treatment of leishmaniasis vary in their efficacy, searches for alternative drugs and new formulations are necessary (Croft 2006b). The ideal drug would be effective, safe, low-cost, low side effects and would not induce resistance (Billo et al. 2005).

*Plectranthus amboinicus* is classified taxonomically in the family Lamiaceae, subfamily Nepetoideae and Ocimeae tribe (Lukhoba et al. 2006). This family has many genus such as mint (*Mentha*), sage (*Salvia*), basil (*Ocimum*) and *Plectranthus*. *Plectranthus* contains about 350 species and can be found in Asia, Africa and Australia (Harley and Reynolds 1992). *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng, synonymous to *Coleus amboinicus* Lour. and *Coleus aromaticus* Benth, is an aromatic plant of Indian origin, perennial, can reach up to 1 m tall, leaves with petioles (1.5- 4.5 cm), high mucilage content, with taste and flavor similar to oregano. It is popularly known as malvariço, malvarisco, mauve, large mint leaf (Matos et al. 1999). It is used in popular medicine for treatment of skin affections, disorders of digestive, urogenital and respiratory tracts, infections and pain (Matos 2000). Scientific studies have confirmed some of these actions, such as anti-inflammatory and antibacterial activities (Chen 2014; Gonçalves et al. 2012; Oliveira et al. 2013).

The present study aims to evaluate the treatment with ethyl acetate extract of the *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (EAEPA) in hamsters infected with *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

## Material and methods

### Obtention of extracts

Leaves of *P. amboinicus* (Lour.) Spreng (8 kg) were collected from the Horto de Plantas Mediciniais Professor Francisco José de Abreu Matos (Fortaleza, Ceará, Brazil). A voucher specimen (EAC40080) has been deposited at the Herbário Prisco Bezerra, Universidade Federal do Ceará, Brazil. The leaves were dried, crushed and triturated with cold ethanol for seven days. After filtration, the material was concentrated on a rotary evaporator under reduced pressure at 40 °C. The procedure was repeated with solvents of increasing polarities (hexane, dichloromethane and ethyl acetate). Phytochemical analysis of the extracts was done in order to identify

major classes of secondary metabolites through chemical reaction which resulted in color development and/or precipitate, characteristic for each class of substances (Matos 1997; Simoes et al. 2007). The ethyl acetate extract was chosen for the accomplishment of the present study based on previous *in vitro* screenings (data not shown).

### **Parasites**

The strain *L. braziliensis* (LTCP 393) was isolated from a 26 year-old-patient with mucocutaneous leishmaniasis. The patient had been treated with various courses of pentoxifylline and Amphotericin B for 20 years before achieving cure. The strain LTCP 393 was considered to be a parasite resistant to antimonial therapy (Costa et al. 2011). Parasites were grown in tubes containing Novy-MacNeal-Nicolle medium (NNN) and Schneider culture medium (Sigma Chem. Co., St. Louis, Mo, USA), 10% heat-inactivated fetal bovine serum, 200 U penicillin/mL and 200 mg streptomycin/ $\mu$ L (All from Sigma). After the fifth passage, the parasites were centrifuged with cold sterile saline at 3,000 rpm for 15 min at 4°C (3 times) and adjusted with RPMI medium to the desired concentration ( $10^6$  promastigotes/mL). The viability of the parasites was assessed by their motility capacity.

### **Animals**

Hamsters (*Mesocricetus auratus*), adults, males, ranging from 8-12 weeks of age, obtained from the Central Animal Facility of the Department of Pathology and Legal Medicine, Universidade Federal do Ceará (UFC), were housed in groups of six to eight per cage with free access to water and food. The project was approved by the Animal Ethics Committee for Research, UFC (protocol number 75/2011).

### **Acute toxicity test**

The acute toxicity evaluation of ethyl acetate extract of *Plectranthus amboinicus* (EAEPA) was carried out, according to the recommendations done by the OECD guideline 425 (2001). A concentration of 2000 mg/kg was administered by gavage to three animals, previously kept fasting for three hours with water ad libitum. Mortality was monitored for 14 days. At the end of this period, other three animals received the same dose of the extract (2000 mg/kg), chosen depending on the number of dead animals in the previous step. If the mortality was equal to that obtained in the previous step, the test would be ended and the LD50, estimated. Otherwise, other three animals would be used (OECD 2001).

### **Experimental infection model**

Stationary-phase promastigotes were inoculated subcutaneously into the hind right footpad of hamsters at a dose of  $10^6$  parasites in 20  $\mu$ L of saline. Observation of lesion development was made at weekly intervals and footpad swelling was measured in millimeters by a dial gauge caliper (Mitutoyo, Japan). The animals were followed for 56 days, which corresponded to 8 weeks of infection. Lesion size was defined as the increase in

footpad thickness after subtraction of the size of the controlateral uninfected footpad. After 4 weeks of infection, when the lesions were apparent, the animals were treated.

### **Treatment**

The animals were randomly allocated into four groups (with 5 animals per group): 1. Group treated with the solubilizing vehicle (1% DMSO v/v); 2. Group treated with Glucantime® (20 mg/kg via intramuscular - i.m.); 3. Group treated with ethyl acetate extract from *P. amboinicus* administered at 4 mg/kg once a day given by intraperitoneal (I.P) and 4. Group treated with ethyl acetate extract from *P. amboinicus* administered at 4 mg/kg once a day given by intralesional (I.L) routes for 30 days.

### **Parasite load**

After the treatment, the animals were euthanized by inhalation of halothane. Popliteal lymph nodes draining the infected footpad and the infected footpad from 3 animals of each group were removed and aseptically macerated in 1 mL of Schneider's medium. Parasite load was determined using the quantitative limiting dilution assay (LDA) as described (Titus et al. 1985, and modified by Smith et al.1994). Briefly, popliteal lymph nodes and infected footpad were aseptically excised and homogenized with a tissue glass grinder in 2 ml of Schneider's medium (Sigma, St. Louis, MO). The homogenates were serially diluted in Schneider's medium supplemented with 100 U of penicillin/ml, 100 µg/ml of streptomycin/ml, 10% heat inactivated fetal calf serum (Gibco) and 2% sterile human urine in 96-well plates (Nunc, Germany) containing biphasic blood agar medium. The plates were sealed and incubated at 26°C for 3 weeks. The parasites were visualized with an inverted optical microscope (AusJena, Germany) every 3 days. The wells containing parasites were registered. The number of parasites present in the lesions and lymph nodes was determined by using ELIDA software (Taswell 1984, modified by Hu and Smith 2009).

### **Histopathological analysis**

Infected footpads from 3 animals of each group were dissected and fixed in 10% neutral buffered formalin. Tissues were mounted in paraffin blocks, sectioned at 5-µm intervals, and stained with hematoxylin and eosin for histological analysis. The following parameters were evaluated: inflammatory infiltrates, granulomatous reactions, vacuolated macrophages, and presence of amastigotes. Each parameter was evaluated according to the intensity of the event through scores: 0 (absence), 1+ (1-25% presence; rare), 2+ (presence of 25 -50%; moderate), 3+ (> 50%; intense). Cellular analysis was evaluated in five fields, using the increase of 1000 x.

### **Statistical analysis**

For comparisons among more than 3 unpaired groups, it was performed the one-way ANOVA with Tukey post-tests. Also, we have used two-way Anova test. All analyses were performed using GraphPad Prism



version 7.0 software for Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). The level of significance for a null hypothesis was 5% ( $P < 0.05$ ).

## Results

### Obtention and phytochemical analysis of the plant extracts

Extract yield from *Plectranthus amboinicus* (L) Spreng is shown in Table 1. Phytochemical analysis of the extracts from fresh leaves of *Plectranthus amboinicus* revealed the presence of flavonol and digitalis glycosides, steroids in the hexane and dichloromethane extracts; flavonol and digitalis glycosides, tannins and steroids in the ethyl acetate extract and flavonol and digitalis glycosides, and anthraquinones and alkaloids in the ethanol extract (Table 2).

### Assessment of acute toxicity

The dose of 2000 mg/kg of the ethyl acetate extract of *P. amboinicus* did not cause the death of any animal. According to the OECD protocol, the LD50 was estimated to be  $> 5000$  mg/kg.

### Treatment with ethyl acetate extracts of *Plectranthus amboinicus*

To evaluate *in vivo* leishmanicidal activity of the ethyl acetate extracts of *Plectranthus amboinicus*, hamsters were infected subcutaneously with *Leishmania* promastigotes ( $10^6$  parasites/footpad). Lesions were apparent 7 days after infection and progressively enlarged to the expected size 4 weeks post-infection ( $1.5 \text{ mm} \pm 0.5 \text{ mm}$ ), as demonstrated by Romao (2013). After this period, the animals were treated via intraperitoneal (I.P) or intralesional (I.L) routes with EAEPa at 4 mg/kg once a day for 4 weeks (Figure 1). Animals that were treated via I.P route with EAEPa showed a lesion thickness of  $0.79 \pm 0.821 \text{ mm}$  in the end of the treatment, which represented a 70% reduction compared to the initial lesion ( $2.65 \pm 1.59 \text{ mm}$ ). The group treated with EAEPa via I.L route showed an increase of the lesion thickness, since the 1st week of treatment (Figure 2). The animals that were treated with Glucantime showed a final lesion thickness of  $0.14 \pm 0.11 \text{ mm}$ , which represented a reduction of 92.7% compared to the initial lesion ( $1.92 \pm 2.04 \text{ mm}$ ).

Comparing lesion thickness among the groups after 4 weeks of treatment, it was found a statistical difference between the Glucantime-treated group and the EAEPa- treated group via I.P route ( $p < 0.01$ ), between Control group and EAEPa-treated group via I.L ( $P < 0.05$ ) and the EAEPa-treated group via I.L route and that treated via I.P route ( $p < 0.05$ ).

In relation to the infected footpad (Figure 3A), parasite load was significantly lower in the group treated with the plant extract via I.P ( $1.75 \times 10^5 \pm 3.58 \times 10^5$  parasites/mL;  $p < 0.05$ ) and in the group treated with Glucantime ( $2.28 \times 10^8$ ;  $p < 0.01$ ), after 4 weeks of treatment, in comparison to the untreated control group ( $2.08 \times 10^8 \pm 8.73 \times 10^9$  parasites/mL). The I.P via of treatment was less efficacious than the I.L via ( $6.75 \times 10^8 \pm 1.77 \times 10^9$ ;  $p < 0.05$ ).

In the lymph nodes, the parasite load was lower than that found in the footpad, for all groups except the Glucantime-treated group ( $1.45 \times 10^2 \pm 1.21 \times 10^2$  parasites/mL) (Figure 3B). However, the group treated with Glucantime presented a statistical difference when compared to the untreated control group ( $p < 0.01$ ) and to the group treated with EAEPA intralesionally ( $p < 0.05$ ). The number of parasites detected in the group treated via I.P with the plant sample ( $1.55 \times 10^4 \pm 1.06 \times 10^4$  parasites/mL) was significantly lower than the untreated control ( $5.796 \times 10^7 \pm 3.75 \times 10^7$  parasites/mL;  $p < 0.05$ ), and significantly lower than the group treated via I.L ( $9.26 \times 10^7 \pm 8.03 \times 10^7$  parasites/mL;  $p < 0.05$ ).

### Histopathological analysis

In the untreated control group (DMSO), macrophages were abundantly present in the lesions, containing amastigotes in their cytoplasm. It was observed exhibited disruption of the epidermis and inflammatory infiltrate comprising macrophages, lymphocytes, and a large collection of polymorphonuclear leukocytes in the dermis. In animals that received EAEPA via I.P, injury was still active, with presence vacuolated macrophages harboring amastigotes and liquefactive foci of necrosis, associated with the presence of leukocytes. The infiltrate was intense, compared the group treated with Glucantime ( $p < 0.05$ ). Animals that were treated with EAEPA administered via I.L showed similar histological findings to the untreated control group in all of the parameters analyzed, but completely different in comparison to the group treated with Glucantime in four of the six parameters analyzed (Table 3). The Glucantime-treated group presented inflammatory infiltrate with macrophages harboring amastigote; however, inflammation came in frank resolution without vacuolated macrophages.

### Discussion

Cutaneous leishmaniasis has a major impact in Latin America, Central Asia, and southwestern Asia. The species which are responsible for leishmaniasis in Latin America can be divided into two taxonomic groups. The first is the subgenus *Viannia*, which includes the species *L. braziliensis*, *L. panamensis*, and *L. guyanensis*, responsible for cutaneous or mucocutaneous lesions. The other is the subgenus *Leishmania*, which includes the species *L. mexicana* and *L. amazonensis*, responsible for localized or diffused skin lesions, and *L. chagasi*, which causes American visceral leishmaniasis (Pereira-Chiocola 2009).

Conventional treatment for leishmaniasis is based on antimonial agents that need to be administered intravenously; moreover, patients require hospitalization because of high toxicity of the drugs, and high rates of treatment failure (Arevalo et al. 2007; Santos et al. 2008; WHO 2010; WHO 2016; Monzote et al. 2013; Suryawanshi et al. 2013). Research should focused on alternative therapeutic management with less toxicity and similar efficacy to the antimonial agents. On this point of view, antimicrobial activity using *in vivo* studies for the evaluation of new compounds is absolutely necessary.

Freitas et al. (2011) have evaluated hamsters infected with *L. (V) braziliensis* and treated with ethyl acetate extract from husk fiber water of *Cocos nucifera*. The extract was administered by gavage, during 21 consecutive days. The plant extract was not able to eliminate the parasite with the treatment. We have recently

shown a good efficacy of a native plant which is not in risk of extinction named *Astronium fraxinifolium* against *L. (V.) braziliensis* in hamster model (Lima et al., 2014). Based on this study and also in previous experience with *P. amboinicus*, which showed a significant antibacterial activity (Gonçalves et al, 2012; Oliveira et al., 2013), we have decided to evaluate if the plant would also display leishmanicidal activity.

To our knowledge, this is the first study in which antimicrobial activity of *Plectranthus amboinicus* against *L. braziliensis* is evaluated in a hamster model. Our results using the plant administered via intraperitoneal showed a decrease in parasite load, in lesion thickness, also in inflammatory parameters, quite similar to the Glucantime-treated animals. One interesting point was that the route of the plant sample made a huge difference. The plant sample administered via intralesional showed a pro-inflammatory profile and high number of parasites. Similar results were observed by Chen (1994), when the author had compared intraperitoneal and intralesional routes to treat hamsters infected with *L. donovani* and treated with licochalcone A. Nonetheless, in a previous report (Lima et al, 2014), we had observed good results, when hamsters infected with *L. (V.) braziliensis* were treated with extract from *A. fraxinifolium* was administered via intralesional route. We can speculate that in the present work, we have not obtained good results when the plant sample was administered via intralesional, because of the presence of particles in the extracts, in spite of spinning the extract, before intralesional infections. Another possibility was that in later stages of infection, some of footpad lesions were cracked, which could result in a probable leakage of extract.

The ethyl acetate extract from leaves of *Plectranthus amboinicus* used in the present study contained flavonol glycosides, digitalis, anthraquinones, alkaloids, tannins and steroids. Other studies report that *P. amboinicus* species is rich in flavonoids such as apigenin, crysoeriol, cirsimaritin, luteolin, quercetin, salvigenin, taxifolin. In addition to flavonoids, reducing sugars, triterpenes, tannins, amino groups and triterpenic steroids are also found (Parra and Ruiz 1999; Castillo and Gonzalez 1999). Other constituents were also reported as oleanolic acid, cratogeolic acid, ursolic acid, pomolic acid, euscaphic acid, tormentic acid (Sahaykhare et al. 2011).

Leishmanicidal activity of plant extracts has been associated with compounds belonging to various chemical groups, such as alkaloids, terpenoids, and flavonoids. For example, compounds derived from alkaloids such as quinoline, isoquinolines and indoles have shown leishmanicidal activity (Klein et al. 2009). Lima et al. (2014) carried out a leishmanicidal screening with essential oil of *P. amboinicus* which contained more than 90% of carvacrol. The sample (at a concentration of 2.5%) was able to reduce 100% of *L. braziliensis* promastigote viability after 48 h incubation. Tempone et al., (2008) demonstrated that the crude extract of *P. amboinicus* at a concentration of 500 µg /mL could completely abolish the growth of *L. chagasi* promastigotes.

The golden hamster model has several advantages for *L. braziliensis* infection, due to clinical similarities to human disease. Previous studies have shown that infection model using hamster ear or footpad with  $10^6$  parasites produced a variable final lesion size (Fonseca 2015; Romão 2013). Male animals were selected for the study because this gender is more susceptible to the *Leishmania* infection than female animals (Travi et al. 2002). In general, clinical skin lesions in hamsters infected with *L. braziliensis* begin with erythema and local edema, evolve into papule, and culminate with nodular or ulcerated presentation (Wilson et al. 1979; Hommel et al. 1995). The period of injury establishment, the clinical presentation and the size of the lesion depend on a number of factors that can lead to various different clinical profiles. In our work, lesions took 10 to

15 days to become apparent as demonstrated before for the same type of experimental model of infection (Lima et al. 2014; Romao 2013; Wilson et al. 1979; Kahl et al. 1991).

Different histopathological patterns can be found in hamster injuries, depending on the time of disease progression. The early stage of infection is characterized by a mixed inflammatory infiltrate. The granulomatous pattern occurs around 15 days of infection, and characterizes the chronic phase of the disease (Laurenti et al. 1990 Kahl et al. 1991 Romao et al. 2013). The main pathological features of chronic lesions in hamsters infected with *Leishmania* subgenus *Viannia* is a granulomatous pattern, with or without necrosis, comprising vacuolated epithelioid macrophages, a variable number of parasites. Lymphocytes, plasma cells, neutrophils and eosinophils can be found around or infiltrating the granuloma (Wilson et al. 1979; Kahl et al. 1991; Adams et al. 1996; Osorio et al. 2003; Gomes-Silva et al. 2013). According to some authors (Ridley 1979; Magalhães et al. 1986), parasite load is directly correlated to the intensity of necrosis and granulomatous reaction; on the contrary, lesions containing low parasite load do not present a granulomatous reaction.

In a study conducted in Argentina, biopsies from patients infected with *L. braziliensis* presented mixed inflammatory infiltrates, necrosis and amastigotes in early stages of the disease (Sinagra et al. 1997). Human and hamster infected with *L. braziliensis* share several histopathological features, such as, granulomas surrounded and/or interspersed with lymphocytes, plasma cells, neutrophils and eosinophils, Schaumann corpuscles (Kahl et al. 1991; Sinagra et al. 2007; Ribeiro-Romão et al. 2014).

In the present work, meanwhile the histopathological analysis showed high parasite load with necrosis and intense infiltration in the untreated group, low number of parasites in macrophages and discrete necrosis were found in the group of animals treated with EAEPA treated via intraperitoneal route.

Finally, even though *P. amboinicus* showed good efficacy, the best parameters were obtained with Glucantime-treated animals. These data reveal that future investigations should evaluate higher concentrations of *Plectranthus amboinicus* and association with other plant extracts, for instance, *Astronium fraxinifolium*.

### **Ethical approval**

All procedures performed in studies involving animals were in accordance with Ethics Committee on Animal Use in Experimentation of the Animal Ethics Committee for Research, Universidade Federal do Ceará (protocol number 75/2011).

### **Conflict of interest**

The authors declare that they have no conflict of interest.

## References

- Adams HR (1996) Physiologic, pathophysiologic, and therapeutic implications for endogenous nitric oxide. *J Am Med Assoc* 209:1297-1302.
- Almeida OL, Santos JB (2011) Advances in the treatment of cutaneous leishmaniasis in the new world in the last ten years: a systematic literature review. *An Bras Dermatol* 86:497–506.
- Alvar J, Vélez ID, Bern C, Herrero M, Desjeux P, Cano J, et al. (2012) Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. *PLoS ONE* 7(5): e35671. doi:10.1371/journal.pone.0035671
- Antinarelli LMR, Pinto NC, Scio E, Coimbra ES (2015) Antileishmanial activity of some Brazilian plants, with particular reference to *Casearia sylvestris*. *Anais da Academia Brasileira de Ciências* 87(2): 733-742. <http://dx.doi.org/10.1590/0001-3765201520140288>
- Arevalo J, Ramirez L, Aduai V, Zimic M, Tulliano G, MirandaVerástegui C, Lazo M, Loayza-Muro R, de Doncker S, Maurer A, Chappuis F, Dujardin JC, Llanos-Cuentas A (2007) Influence of *Leishmania* (*Viannia*) species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. *J Infect Dis* 195:1846–1851 doi:10.1086/518041
- Billo AM, Fourneta A, Cabalionb BP, Waikedreb J, Boriesc C, Loiseauc P, Prinaa E, Rojas de Ariase A, Yaluffe G, Fourneaua C, Hocquemiller R. (2005) Screening of New Caledonian and Vanuatu medicinal plants for antiprotozoal activity. *Journal of Ethnopharmacology* 96:569–575. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2004.10.006>
- Castillo RAM, Gonzalez VP (1999) *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. *Rev. Cubana Plant. Med* 3:110-5.
- Chan-Bacab MJ, Pena-Rodríguez LM (2001) Plant natural products with leishmanial activity. *Nat. Prod. Rep* 18:674-688.
- Chen M, Christensen SB, Theander TG, Kharazmi A (1994) Antileishmanial activity of licochalcone A in mice infected with *Leishmania major* and in hamsters infected with *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother* 38:1339–1344. doi:10.1128/AAC.38.6.1339
- Costa DL, Carregaro V, Lima-Júnior DS, Silva NM, Milanezi CM, Cardoso CR, Giudice A, De Jesus AR, Carvalho EM, Almeida R, Silva JS (2011) BALB/c mice infected with antimony treatment refractory isolate of *Leishmania braziliensis* present severe lesions due to IL-4 production. *PLoS Negl. Trop. Dis* 5(3):965. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000965>
- Croft SL, Sundar S, Fairlamb AH (2006a) Drug resistance in leishmaniasis. *Clin. Microbiol.* 19(1):111-126. <http://dx.doi.org/10.1128/CMR.19.1.111-126.2006>
- Croft SL, Seifert K, Yardley V (2006b) Current scenario of drug development for leishmaniasis. *Indian J Med Res.* 123(3):399-410.
- Desjeux P (2004) Leishmaniasis: current situation and new perspectives. *Comp Immunol Microbiol Infect Dis.* 27(5):305-18. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004>

Fonseca FRM (2015) Influência da carga parasitária e do sítio de inoculação na Imunopatogênese da leishmaniose cutânea causada por *Leishmania braziliensis* em hamster. Dissertation., Universidade Federal do Ceará.

França F, Lago EL, Marsden PD (1996). Plants used in the treatment of leishmanial ulcers due to *Leishmania (Viannia) braziliensis* in an endemic area of Bahia, Brazil. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 29:229-232.

Freitas JCC, Nunes-Pinheiro, DCS, Pessoa AWP, Silva LCR, Girão, Belarmino VCC, Lopes-Neto E, Agostinho MS, Abreu CRA. (2011) Effect of ethyl acetate extract from husk fiber water of *Cocos nucifera* in *Leishmania braziliensis* infected hamsters. *Brazilian Journal of Pharmacognosy* 21(6): 1006-1011. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000138>

Gomes-Silva A, Valverde JG, Ribeiro-Romão RP, Plácido-Pereira RM, Da-Cruz AM (2013). Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. *Parasitology* 140: 771–779. <http://dx.doi.org/10.1017/S0031182012002156>

Harley RM, Reynolds T (1992) *Advances in Labiatae Science*. Great Britain: Royal Botanic Gardens Kew.

Hommel M, Jaffe CL, Travi B, Milon G (1995) Experimental models for leishmaniasis and for testing anti-leishmanial vaccines. *Ann. Trop. Med. Parasitol* 89:55–73. <http://dx.doi.org/10.1080/00034983.1995.11813015>

Hu Y, Smyth GK (2009) ELDA: Extreme limiting dilution analysis for comparing depleted and enriched populations in stem cell and other assays. *Journal of Immunological Methods* 347:70-78. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jim.2009.06.008>

Kahl LP, Byram JE, David JR, Comerford SA, Von Lichtenberg F (1991) *Leishmania (Viannia) braziliensis*: comparative pathology of golden hamsters infected with isolates from cutaneous and mucosal lesions of patients residing in Tres Bracos, Bahia, Brazil. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 44:218–232

Klein, T, Longhini R, Bruschi ML, Mello JCP (2009) Fitoterápicos: um mercado promissor. *Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada* 30(3):241-248.

Laurenti MD, Duarte MIS, Sinhorini IL, et al (1990). Experimental visceral leishmaniasis in inbred hamsters: strain. *Memorias do Instituto Oswaldo Cruz*[S.l: s.n.].

Lima SCG et al. (2014) In Vitro and In Vivo Leishmanicidal Activity of *Astronium fraxinifolium* (Schott) and *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng against *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *BioMed Research International*. 2014:1-7. <http://dx.doi.org/10.1155/2014/848293>

Lukhoba CW, Simmonds MSJ, Paton AJ (2006) *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. *Journal of Ethnopharmacology* 103(11):1-24. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2005.09.011>

Magalhães AV, Moraes MAP, Raick AN, Llanos-Cuentras A, Costa JML, Cuba CC, Marsden PD (1986) Histopatologia da leishmaniose tegumentar Americana por *Leishmania braziliensis*: padrões histopatológicos e estudo evolutivo das lesões. *Rev Inst Med Trop*. 28:253-262.

- Matos FJA, et al (1999) Essential oil of *Mentha x villosa* Huds. *Journal of Essential Oil Research* 11:41-44.
- Matos FJA (1997) *Introdução a fitoquímica experimental*. Edições UFC.
- Meheus F, Balasegaram M, Olliaro P, Sundar S, Rijal S, Faiz MD, Boelaert M (2010) Cost-effectiveness analysis of combination therapies for visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. *PLoS Negl Trop Dis* 4(9): e818. <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0000818>
- Monzote L, Garcia M, Scull R, Cuellar A, Setzer WN (2013) Antileishmanial activity of the essential oil from *Bixa orellana*. *Phytother Res*. 28(5):753-8. doi: 10.1002/ptr.5055.
- OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. (2001) *Guideline for Testing of Chemicals: Acute oral toxicity – Acute Toxic Class Method*. Paris: OEDC, Guideline.
- Osorio Y, Melby PC, Pirmez C, Chandrasekar B, Guarín M, Trav BJ (2003) The site of cutaneous infection influences the immunological response and clinical outcome of hamsters infected with *Leishmania panamensis*. *Parasite Immunology*. 25(3):139-148. <http://dx.doi.org/10.1046/j.1365-3024.2003.00615.x>
- Parra V, Ruiz RA (1999) *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Óregano Francês). *Estúdio toxinogênico de um extracto fuido y del aceite essencial*. *Rev. Cubana de Plant Med*. 2: 68-73.
- Pereira-Chioccola VL (2009) Diagnóstico molecular das leishmanioses: contribuição ao Programa de Vigilância e Controle da LVA no Estado de São Paulo. *BEPA. Bol Epidemiol Paul (Online)* 6:4-13.
- Ribeiro-Romão RP, Moreira OC, Osorio EY, Cysne-Finkelstein L, Gomes-Silva A, Valverde JG, Pirmez C, Da-Cruz AM, Pinto EF (2014) Comparative evaluation of lesion development, tissue damage and cytokine expression in golden hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected by inocula with different *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* concentrations. *Infect Immun*. 82(12):5203-5213. doi:10.1128/IAI.02083-14
- Ridley DS (1979) The pathogenesis of cutaneous leishmaniasis. *Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg*. 73: 150-160.
- Romão RPR (2013) *Influência do tamanho do inóculo de Leishmania (Viannia) braziliensis Na imunopatogênese da leishmaniose cutânea experimental no modelo golden hamster (Mesocricetus auratus)*. Tese. Instituto Oswaldo Cruz.
- Sahaykhare R, Banerjee S, Kundu K (2011) *Coleus aromaticus* Benth. – A Nutritive Medicinal Plant of Potential therapeutic value. *International Journal of Pharma and Bio Sciences*. 2 (3);488-500.
- 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 (2008) Leishmaniasis treatment—a challenge that remains: a review. *Parasitol Res* 103:1–10. doi:10.1007/s00436-008-0943-2
- Simões CMO (2007) *Farmacognosia – da planta ao medicamento*. 6. ed. São Paulo: Pharmabooks,
- Sinagra A, Luna C, Abraham D, Iannella MC, Riarte A, Krolewiecki A (2007) The activity of azithromycin against *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* and *Leishmania* (*Leishmania*) *amazonensis* in the golden hamster model. *Rev Soc Bras Med Trop* 40:627-630. <http://dx.doi.org/10.1590/S0037-86822007000600005>

- Soto J, et al. (2004) Miltefosine for New World cutaneous leishmaniasis. *Clinical infections disease*, 38(9):1266-1267.
- Sundar S, Chakravarty J (2010) Antimony Toxicity. *Int J Environ Res Public Health* 7:4267-77. <http://dx.doi.org/10.3390/ijerph7124267>
- Suryawanshi SN, Kumar S, Shivahare R, Pandey S, Tiwari A, Gupta S (2013) Design, synthesis and biological evaluation of aryl pyrimidine derivatives as potential leishmanicidal agents. *Bioorg Med Chem Lett* 23:5235–5238. doi:10.1016/j.bmcl.2013.06.060
- Taswell, C (1984) Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies III. Validity tests for the single-hit Poisson model. *J. Immunol. Meth.* 72: 29-40.
- Tempone AG, Sartorelli P, Teixeira D, Prado FO, Calixto IARL, Lorenzi H, Melhem MSC (2008) Brazilian flora extracts as source of novel antileishmanial and antifungal compounds. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 103(5): 443-449. <http://dx.doi.org/10.1590/S0074-02762008000500006>
- Titus RG, Marchand M, Boon T, Louis JA (1985) A limiting dilution assay for quantifying *Leishmania major* in tissues of infected mice. *Parasite Immunology* 7:545-555
- Travi BL Osorio YP, Melby C, Chandrasekar B, Arteaga L, Saravia NG (2002) Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania* spp *Infection and Immunity* 70:2288–2296. <http://dx.doi.org/10.1128/IAI.70.5.2288-2296.2002>
- Wilson HR, Dieckmann BS, Childs GE (1979) *Leishmania braziliensis* and *Leishmania mexicana*: experimental cutaneous infections in golden hamsters. *Exp Parasitol* 47(2):270-83.
- World Health Organization (WHO) (2010) Technical Report Series 949—control of leishmaniases. Report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniases, Geneva, 22-26.
- World Health Organization (WHO) 2016. Leishmaniasis. Geneva. 2016. Sep. 2016. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>



### Figure Legends:

**Fig. 1** Lesion thickness of hamsters (*Mesocricetus auratus*) infected with  $10^6$  promastigotes of *Leishmania braziliensis* in the right hind paw and treated with acetate extract of *P.amboinicus* via intraperitoneal or intralesional routes for five weeks.

**Fig. 2** Aspects of the footpad of animals infected with  $1 \times 10^6$  promastigotes of *L. (V.) braziliensis* over four weeks of treatment. The treatment was initiated at 4 weeks post infection and was conducted once a day for 4 weeks. The groups were control group that received the solubilizer DMSO (1%); group treated with Glucantime (20mg/kg/day) via intramuscular; groups treated with EAEPA (4mg/kg/day) intraperitoneally (i.p) or intralesionally (i.p).

**Fig. 3** Parasitic load in the paw (a) and in the lymph nodes close to the lesion (b) in hamsters infected with  $10^6$  promastigotes of *L. braziliensis* and treated with ethyl acetate extract of *P. amboinicus* during five weeks.

### Footnotes

#### Fig. 1

The data represent arithmetic mean  $\pm$  SD per group. The dashed line represents the thickness of uninfected footpads. Time zero represents a measurement of the footpad before starting treatment. SD= standard deviation; EAEPA= ethyl acetate extract from *P. amboinicus*. \*Represented a significant difference between the extract via intralesional group treated with the extract via intraperitoneal group ( $p < 0.05$ , two-way Anova test). \*\* Represented a statistically significant difference between Glucantime group and the group treated with EAEPA intraperitoneal and the control group ( $p < 0.01$ , two-way Anova test).

#### Fig. 3

The results are expressed as the arithmetic mean  $\pm$  SD statistical significance. SD= standard deviation; EAEPA= ethyl acetate extract from *P. amboinicus*. \*\*  $p < 0.01$ ; \*\*\*  $p < 0.001$ .

### Table 3

PMN: Polymorphonuclear leucocytes; N.S.: not significant. The EAEPA- and DMSO- treated groups were compared to the Glucantime- treated group using Anova one-way test with Tukey post test.

Figure 1

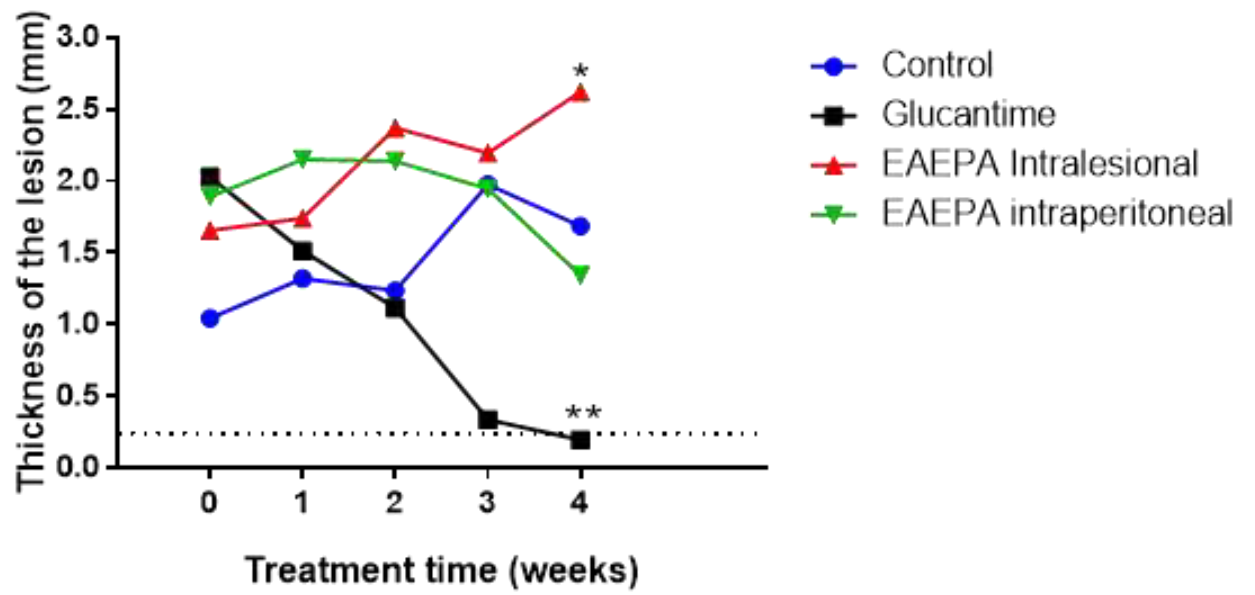


Figure 2

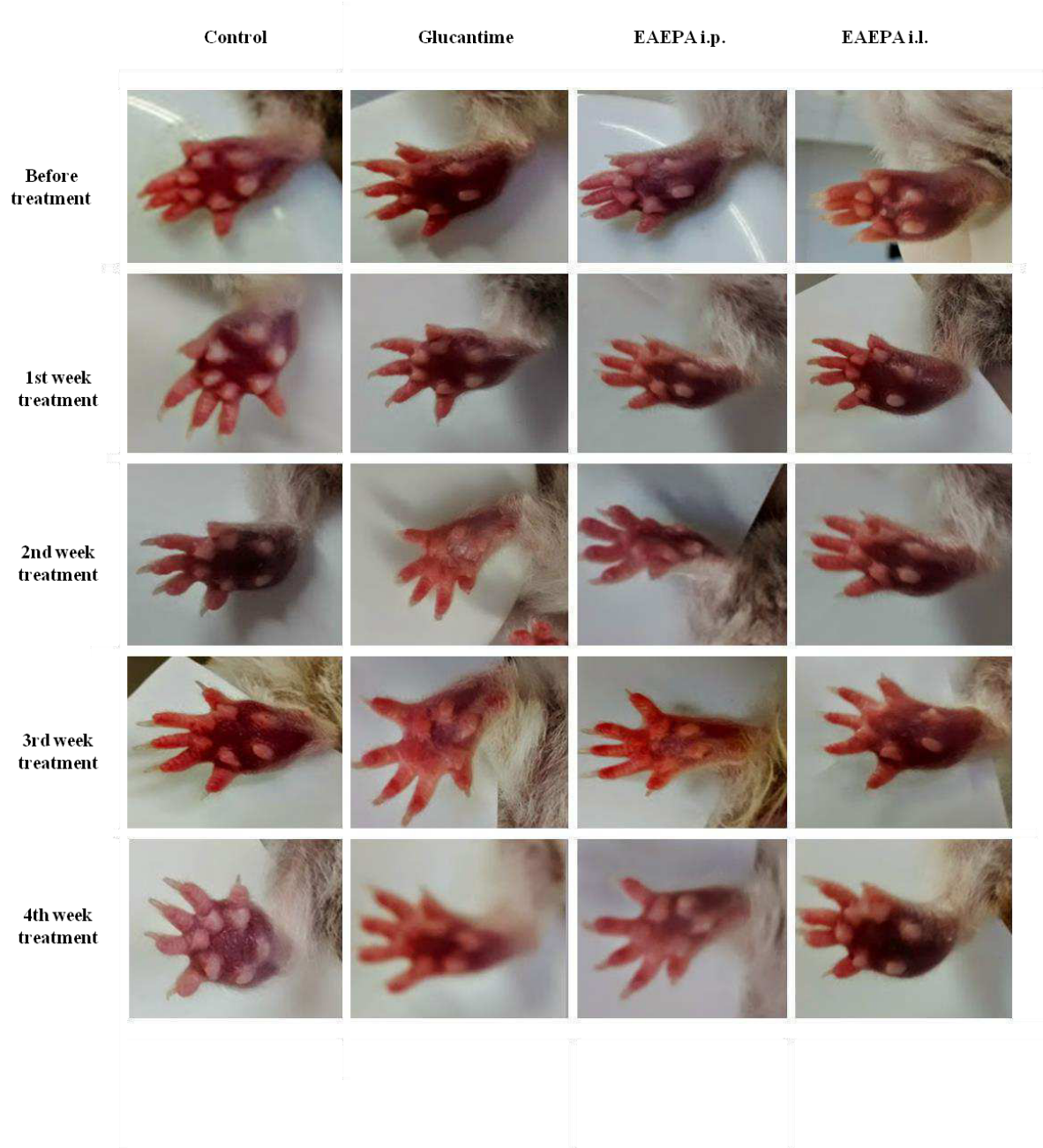
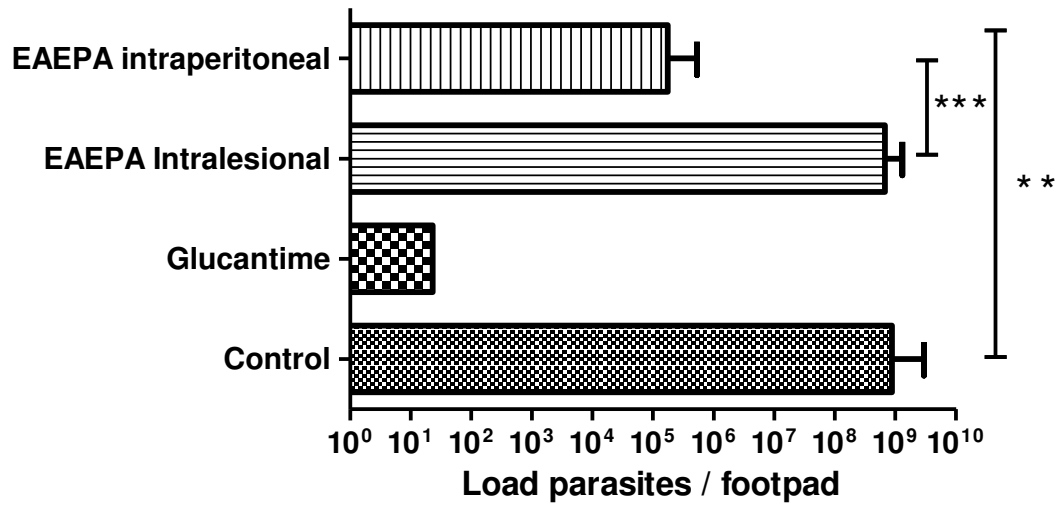
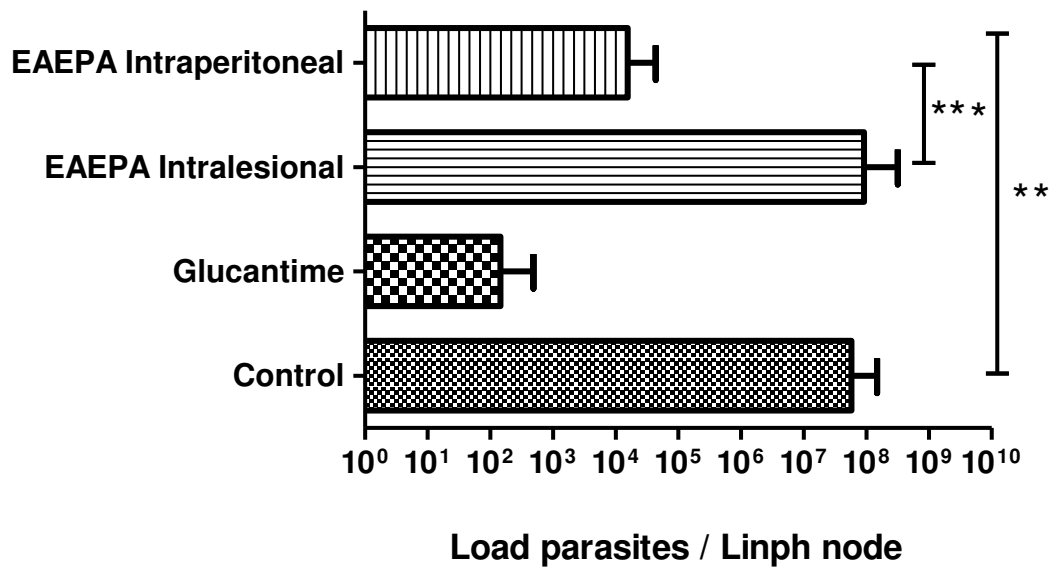


Figure 3

**A****B**

**Table 1** Extract yield from *Plectranthus amboinicus* (L) Spreng.

Extract	Yield
Ethanol	0,37% (29.44g)
Hexane	0,69% (55.41g)
Dicloromethane	0,38% (30.25g)
Ethyl acetate	0,06% (5.0g)

**Table 2** Phytochemicals analysis of the hexane (EH), dichloromethane (ED), ethyl acetate (EAEPA) and ethanol (EE) extracts obtained from fresh leaves of *Plectranthus amboinicus*.

Phytochemical analysis	EH	ED	EAEPA	EE
Flavonol heterosides	+	+	+	+
Antocianic heterosides	-	-	-	-
Digitalis	+	+	+	+
Anthraquinones	-	-	-	+
Saponins	-	-	-	-
Alkaloids	-	-	-	+
Tannins	-	-	+	-
Steroids	+	+	+	-
Triterpenes	-	-	-	-

**Table 3.** Histopathological analysis of paw lesions from golden hamsters infected with *Leishmania braziliensis*, and treated via intraperitoneal (IP) or intralesional (IL) routes during 4 weeks with ethyl acetate extract or Glucantime. The events were graded according to their frequency in the lesion: 0, + (1-25%), ++ (25-50%), +++ (> 50%).

	Infiltrate	Necrosis	PMN	Macrophages	Vacuolated macrophages	Amastigotes
<b>Uninfected</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Control (DMSO)</b>	+++	++	+	++	+	++
<i>p</i>	<0.01	<0.01	N.S.	<0.05	N.S.	<0.05
<b>Glucantime®</b>	+	-	-	+	-	-
<b>EAEPA (via IP)</b>	+++	+	-	+	+	+
<i>p</i>	<0.05	N.S.	<0.05	N.S.	N.S.	<0.05
<b>EAEPA (via IL)</b>	+++	++	+	+	+	++
<i>p</i>	<0.05	<0.01	<0.05	N.S.	N.S.	<0.01

**Obs.** PMN: Polymorphonuclear leucocytes; N.S.: not significant. The EAEPA- and DMSO- treated groups were compared to the Glucantime- treated group using Anova one-way test with Tukey post test.

**CAPÍTULO V**

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO* E *IN VIVO* DO  
EXTRATO ACETATO DE ETILA DAS FOLHAS DE  
*Plectranthus amboinicus* CONTRA *Leishmania (Viannia)*  
*braziliensis***

**ARTIGO II- EM ELABORAÇÃO**

---

**Atividade leishmanicida *in vitro* e *in vivo* do extrato acetato de etila das folhas de *Plectranthus amboinicus* contra *Leishmania (Viannia) braziliensis***

Thially Braga Gonçalves<sup>1,2</sup>; Naya Lucia de Castro Rodrigues<sup>3</sup>; Milena Aguiar Braga<sup>1</sup>; Raphael de Oliveira Rodrigues<sup>1</sup>; Paulo Riceli Vasconcelos Ribeiro<sup>5</sup>; Kirley Marques Canuto<sup>5</sup>; Gilvandete Maria Pinheiro Santiago<sup>4</sup>; Margarida Maria de Lima Pompeu<sup>3</sup>; Maria Jania Teixeira<sup>3</sup>; Aparecida Tiemi Nagao-Dias<sup>1</sup>.

1- Depto. Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem – FFOE. Universidade Federal do Ceará.

2- Centro Universitário Leão Sampaio, UNILEAO, Juazeiro do Norte, CE, Brazil.

3- Depto. Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, Ceará, Brazil.

4- Depto. De Farmácia, Faculdade de Farmácia Odontologia e Enfermagem. Universidade Federal do Ceará. Fortaleza, Ceará, Brazil.

5- Embrapa Agroindústria Tropical, Rua Doutora Sara Mesquita, 2270 – Pici, CEP 60511-110 Fortaleza, CE, Brazil.

**Correspondent author:**

**Thially Braga Gonçalves**

**Department of Clinical Analysis and Toxicology**

**Faculty of Pharmacy**

**Universidade Federal do Ceara**

**Rua Capitaó Francisco Pedro, 1210**

**CEP 60430-372 Fortaleza, Ceará, Brazil**

**Email: thially@gmail.com**

**Phone: 55-85-3366 8270**

**Fax:55-85-3366 8292**

## Resumo

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito *in vitro* e *in vivo* do extrato acetato de etila de *P. amboinicus* (EAEPA) na infecção por *L. braziliensis*. Foi realizado um screening com os extratos hexano, diclorometano e acetato de etila de *P. amboinicus* a fim de testa-los quanto à atividade leishmanicida *in vitro* contra as formas promastigotas de Leishmania. Uma vez que o EAEPA mostrou a inibição de 98,5% de promastigotas na concentração 4mg/mL, foi selecionado para os demais ensaios *in vitro* e *in vivo*. A composição química de EAEPA foi analisada por UPLC–QTOF–MS. Para avaliar o efeito contra as formas amastigotas, macrófagos intraperitoneais murinos foram infectados ou não com *L. braziliensis* e tratados com diferentes concentrações de EAEPA, por 24h. Foram analisadas a citotoxicidade, carga parasitária e a produção de citocinas. Para o ensaio *in vivo*, camundongos BALB/c (n=15) foram infectados com  $10^7$  promastigotas de *L. braziliensis* na orelha direita. Após o aparecimento das lesões, os animais foram divididos em três grupos: DMSO 1%; Antimônio (20mg/kg/dia, I.M., 15 dias); EAEPA (250mg/kg/dia, I.P., 15 dias) A espessura da lesão foi representada pela diferença de diâmetro entre a orelha direita infectada e a orelha contralateral não infectada. A carga parasitária foi calculada através da técnica de diluição limitante. A expressão de citocinas e mediadores da resposta à infecção por Leishmania foram analisados RT-PCR. A análise histopatológica das orelhas infectadas foi realizada. A identificação dos compostos químicos de EAEPA revelou a presença de ácido quínico, ácido protocatecuico, ácido cafeico, cumaroilmalato, timoquinona, ácido siringico, ácido rosmarinico, luteolina, apigenina, tricine e cirsimaritina. Os resultados *in vitro* mostraram que EAEPA apresentou citotoxicidade a partir da concentração 0,125mg/mL com 43% de inibição do crescimento celular. O tratamento com EAEPA *in vitro* mostrou redução significativa da carga parasitária a partir da concentração 0,03mg/mL. Nas células tratadas com EAEPA, observou-se aumento dos níveis de TNF $\alpha$  e IL-10, manutenção dos níveis de TGF $\beta$ ; e diminuição da produção de IL-4. Nos experimentos *in vivo*, EAEPA administrado via intraperitoneal reduziu eficientemente a espessura da lesão, a carga parasitária e os parâmetros inflamatórios em camundongos BALB/c, comparados ao controle não tratado, apresentando um perfil de expressão de citocinas semelhante ao encontrado nos experimentos *in vitro*. Em suma, os dados mostraram que, em animais infectados com *L. braziliensis*, EAEPA é capaz de induzir o controle da lesão, sugerindo que isso possa ocorrer em função da diminuição da carga parasitária, bem como, através de uma imunorregulação do processo inflamatório.



## Introdução

As leishmanioses são antropozoonoses causadas por protozoários do gênero *Leishmania*, consideradas um grande problema de saúde pública e representam um complexo de doenças com importante espectro clínico e diversidade epidemiológica. Constituem doenças endêmicas em regiões tropicais, subtropicais, em 98 países distribuídos em todos os continentes, exceto Antártida e Oceania, e sua notificação é compulsória em apenas 30 deles (DESJEAUX, 2004; ALVAR et al., 2012; WHO, 2015).

Dados da OMS indicam que 350 milhões de pessoas estão expostas ao risco de contrair a doença, com registro aproximado de dois milhões de novos casos, das diferentes formas clínicas ao ano (ALVAR et al., 2012; WHO, 2015).

Apesar da existência de muitas pesquisas, a quimioterapia de primeira escolha é ainda baseada em antimoniais pentavalentes complexados a carboidratos, na forma de estibogluconato de sódio (Pentostan) e antimoniato de meglumina (Glucantime). No entanto, essas drogas apresentam elevada toxicidade e que podem levar à resistência do microrganismo. O uso continuado do medicamento pode provocar acúmulo em órgãos como baço e fígado, além de causar efeitos como mialgia, pancreatite, arritmia cardíaca e hepatite, efeitos esses que levam ao abandono do tratamento (CHAN-BACAB; PEÑA-RODRIGUEZ, 2001; CROFT; SUNDAR; FAIRLAMB, 2006). A segunda escolha para o tratamento, a Anfotericina B, é a primeira droga oral efetiva contra a leishmaniose cutânea, na Colômbia, e contra a visceral, na Índia (SOTO, et al., 2004; SUNDAR, 2010). Ela também possui uma alta toxicidade, e embora haja sua formulação lipídica (de menor toxicidade), esta é muito cara para uso rotineiro em países em desenvolvimento (MEHEUS et al., 2010).

Como a variabilidade quanto à eficácia do tratamento com antimoniais na leishmaniose tem sido um problema recorrente, drogas alternativas e novas formulações estão sendo avaliadas e registradas para uso em alguns países (SEIFERT, K. & CROFT, 2004).

Paralelamente, torna-se essencial a busca de compostos que possibilitem o desenvolvimento de novos fármacos efetivos, mais seguros, com baixo custo, sem efeitos colaterais e que não induzam resistência. Pesquisas com substâncias anti-protozoárias, originárias de plantas medicinais, caracterizam uma tarefa multidisciplinar que envolve pesquisadores e estudantes dos campos da botânica, fitoquímica, parasitologia, farmacologia e medicina (BILLO et al., 2005).

*Plectranthus amboinicus* é classificada taxonomicamente dentro da família Lamiaceae, subfamília Nepetoideae e tribo Ocimeae (LUKHOB, SIMMONDS, PATON,

2006). Esta família possui diversos gêneros tais como hortelã (*Mentha*), sálvia (*Salvia*), manjeriço (*Ocimum*) e *Plectranthus* sendo que este último contém cerca de 350 espécies e pode ser encontrado na Ásia, África e Austrália (HARLEY & REYNOLDS, 1992). *P. amboinicus* é conhecida popularmente no Brasil como malvariço, malvarisco, malva, hortelã da folha grande, hortelã grossa e hortelã grande (MATOS, MACHADO, CRAVEIRO, & BARBOSA-FILHO, 1999). É uma das espécies mais documentadas na família Lamiaceae, especialmente por suas propriedades medicinais, como ação anti-inflamatória, antimicrobiana, antitumoral e Leishmanisica (MATOS, 2000; TEMPONE, 2008) compreendendo cerca de 68% de todas as aplicações usuais deste gênero, é também comumente conhecida como *Indian borage* e *Coleus amboinicus* (LUKHOBBA, SIMMONDS, PATON, 2006).

O presente trabalho buscou avaliar a composição química e atividade leishmanicida do extrato acetato de etila de *Plectranthus amboinicus in vitro* contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. (V.) braziliensis* e *in vivo* em modelo experimental de infecção na orelha de camundongos BALB/c.

## **Material e métodos**

### **Obtenção do extrato**

A coleta das folhas de *P. amboinicus* foi realizada no Horto de Plantas Medicinais Francisco José de Abreu Matos da Universidade Federal do Ceará (HPM-FJAM/UFC). Uma exsicata está depositada no Herbário Prisco Bezerra da Universidade Federal do Ceará – UFC, sob o registro #40080. As folhas (8kg) foram secadas, trituradas e submetidas à extração sequencial com hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol, obtendo-se os extratos cujos rendimentos foram: 0,69%; 0,38%; 0,06% e 0,37% respectivamente.

### **Caracterização química**

Os testes fitoquímicos de cada extrato foram realizados de acordo com MATOS (1997), a partir de uma solução hidrofílica (etanol com 30% de água). Sete tubos de ensaio contendo volumes de 3 a 4 mL de suspensão e dois béqueres contendo volumes de 10 mL de

suspensão foram deixados em banho-maria até secura e mantidos em dessecador até a realização dos testes. Foram realizados testes para alcaloides, saponinas, Lieberman-Burchard (esteróides e triterpenóides), flavonóis, flavanonas, flavanonóis e xantonas, antocianidinas, antocianinas e flavonoides e taninos (MATOS, 1997).

### **Análise da composição química por UPLC–QTOF–MS**

A análise de UPLC/Qtof MSE foi realizada em sistema Acquity UPLC (Waters) acoplado com um sistema Quadrupole/TOF (Waters). Para a análise utilizou-se uma coluna Waters Acquity UPLC BEH (150x2,1mm, 1,8 um), com a temperatura da coluna fixada a 40 ° C. As fases móveis foram água com 0,1% de ácido fórmico (A) e acetonitrilo com ácido fórmico a 0,1% (B). O gradiente utilizado consistiu em: (0-22,2) min, 12-25% B; (22,3-33,4) min, 25,1-60% de B; (33,5-34,0) min, 100% de B; (34,1-35,5) min, 12% de B; (35,6-37,5) min, 12% de B. A taxa de fluxo como 0,300 mL / min. O volume de injeção da amostra foi de 5 uL. A análise foi em modo ESI + e adquirida de 110 a 1180 Da. A temperatura da fonte era de 120 ° C, temperatura de dessolvatação de 350 ° C e fluxo de dessolvatação de 500 L / h. Utilizou-se a enucalina de leucina como massa de bloqueio. O modo de aquisição foi MSE. O instrumento foi controlado pelo software Masslynx 4.1 (Waters Corporation).

### **Parasitos**

Cepa de *Leishmania (Viannia) braziliensis*, LTCP 393, isolada de paciente com leishmaniose cutânea, foi gentilmente cedida pela Profa. Dra. Maria Jania Teixeira do Departamento de Patologia, Universidade Federal do Ceará. A virulência da cepa foi mantida através de passagem regular em hamster dourado. Após serem recuperados os parasitos através de aspirado do linfonodo de drenagem da lesão, os mesmos foram cultivados em meio N.N.N, contendo meio Schneider (Sigma, USA) suplementado com urina humana, soro bovino fetal (Gibco, USA) (20%), L-glutamina, Penicilina/Estreptomicina por 7 dias a 25°C em estufa do tipo B.O.D. Para garantir a virulência da cepa, só foram utilizados nos experimentos os parasitos obtidos até a 5ª passagem em cultura. Os parasitos foram submetidos a um ciclo de lavagem com salina estéril gelada, com centrifugação a 1.500 rpm, por 15 min a 4°C e ajustados com meio Schneider suplementado para as concentrações

desejadas em cada experimento. A viabilidade dos parasitos foi analisada por sua motilidade através da observação em câmara de Neubauer e microscópio óptico no aumento de 40x.

### **Avaliação da atividade contra formas promastigotas**

A atividade contra formas promastigotas de *L. (V.) braziliensis* foi analisada através de cultivo (TEIXEIRA, 1999) em placas de cultura de 48 poços (Costar, USA). Cada poço recebeu 200 µL do meio contendo  $5 \times 10^6$  formas promastigotas de *L. braziliensis*, 200 µL do meio Schneider suplementado e diferentes concentrações dos extratos hexano, diclorometano, acetato de etila ou etanóico de *P. amboinicus* (0,5; 1,0; 2,0; 4,0 mg/mL). A seguir, as microplacas foram incubadas a 26°C pelos tempos de 24 e 48 h, em estufa tipo B.O.D. (Fanem, Brasil). Foram utilizados os seguintes controles: a) meio Schneider suplementado contendo as formas promastigotas de *L. braziliensis*; b) diluente DMSO 1%; c) Glucantime®, (Sanofi, USA) na concentração de 32 mg/mL. Após incubação, foi retirada uma alíquota de suspensão de células (10µL), adicionado formol a 2% (45µL) e corante azul de Tripan (Gibco-Laboratories) (45µL), para contagem das formas promastigotas em câmara de Neubauer com auxílio de um microscópio óptico com aumento de 40 vezes. Os ensaios foram realizados em sextuplicata e foram repetidos em três experimentos independentes.

### **Obtenção de macrófagos murinos**

Macrófagos de camundongos albinos *Swiss* (provenientes do Biotério Central da Universidade Federal do Ceará), previamente estimulados com 2 mL de solução de tioglicolato de sódio 3% por via intra-peritoneal (i.p.), foram obtidos por lavagem peritoneal com 10mL de RPMI contendo heparina (10UI/mL). As células foram centrifugadas (1.500 rpm, 10min a 4°C), lavadas com salina a 0,9% e ajustadas para a concentração desejada ( $2 \times 10^6$  células/mm<sup>3</sup>) em RPMI contendo soro bovino fetal (SBF), 10% 50 µM de 2-mercaptoetanol, 2 mM L-glutamina, e antibióticos (100 U/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina).

### **Teste de citotoxicidade**

Para a realização do teste de análise de citotoxicidade do extrato acetato de etila de *Plectranthus amboinicus* em macrófagos, utilizou-se a coloração das células por azul de Tripán 0,4%, Macrófagos na concentração de  $2 \times 10^6$  células/mm<sup>3</sup> foram cultivados em tubos estéreis de 1mL (tipo eppendorf) com o extrato acetato de etila de *P. amboinicus* ou com o antimonial Glucantime®, (Sanofi, USA) diluídos em RPMI contendo DMSO 1% nas concentrações de 0,008 a 4mg/mL. Foram usados dois controles negativos: um apenas com macrófagos e outro com macrófagos e DMSO a 1%. As culturas foram incubadas por 24 horas a 37°C em estufa CO<sub>2</sub>. Após, esse período foram coradas com solução de azul de Tripán 0,4%, sendo a percentagem de células não viáveis determinada, utilizando-se câmara de Neubauer e microscópio óptico em aumento de 40 vezes. O cálculo das células não viáveis foi feito, aplicando-se a seguinte fórmula: lise celular (%) = número de células não viáveis (coradas) ÷ total de células (coradas e não coradas) x 100. Foram consideradas não citotóxicas concentrações que produziram  $\geq 20\%$  de morte celular ( $\geq 80\%$  de células viáveis) (TEIXEIRA, 2001).

### **Avaliação da atividade contra formas amastigotas**

Macrófagos foram cultivados em placas de 24 poços (Falcon®, U.S.A), em sextuplicata, fundo chato, contendo lamínulas circulares de 13mm (Glasscyto®, U.S.A) na concentração de  $10^6$  células/mL em RPMI+SBF e antibióticos, e incubados por um período de 48h a 37°C em estufa (Thermo, U.S.A) contendo 5% de CO<sub>2</sub>. A seguir, as células foram lavadas com RPMI a 37°C. Promastigotas de *L. (V.) braziliensis*, em fase estacionária de crescimento, foram adicionadas na razão de 10:1 macrófago e as culturas foram incubadas por 24 h a 37°C em estufa contendo 5% de CO<sub>2</sub>. Após esse período, as células foram lavadas novamente com RPMI a 37°C. O extrato acetato de etila de *P. amboinicus* foi adicionado em diversas concentrações (0,03-0,25 mg/mL em DMSO 0,5%), juntamente aos controles Glucantime (20 µg/mL) ou com o veículo de solubilização (DMSO 0,5%). Após 24h de incubação, as células foram lavadas mais uma vez com meio RPMI a 37°C (TEIXEIRA, 1999).

Para quantificar o nível de infecção dos macrófagos, as lamínulas contendo as células foram lavadas com solução salina 0,9% e, em seguida, fixadas e coradas com corante Giemsa (Sigma-Aldrich,USA). As lamínulas coradas foram montadas em lâminas de vidro e examinadas em microscopia óptica a uma ampliação de 100x com óleo de imersão. Cinquenta

células foram examinadas e o número de amastigotas por 50 células foi determinado. A leitura foi feita de maneira que o observador não tivesse conhecimento sobre os controles tampouco sobre os testes.

### **Dosagem de citocinas**

As concentrações de IL-4, IL-10, TGF- $\beta$  e TNF- $\alpha$  nos sobrenadantes obtidos da cultura de macrófagos foram determinadas utilizando-se a técnica imunoenzimática em fase sólida (ELISA), como recomendado pelo fabricante dos kits (BD Biosciences, San José, CA, USA). Resumidamente, placas de 96 poços, fundo chato (Costar, USA) foram sensibilizadas por 12h com os anticorpos de captura anti-citocinas na concentração determinada a 4°C. As placas foram lavadas, utilizando-se solução de lavagem (PBS com Tween 20 a 0,05%), e em seguida foi realizado bloqueio com tampão fosfato de sódio (PBS), pH 7,4, contendo soro bovino fetal (SBF 10%), seguido de incubação por 1 hora a temperatura ambiente. Após lavagem com PBS- Tween 20 foram adicionados os padrões e as amostras em duplicata e, em seguida, as placa foram incubadas novamente por 2 h ou por uma noite (dependendo da citocina) à temperatura ambiente. Após lavagem com PBS-Tween 20, as placas foram incubadas por mais 1 h com os conjugados anti-citocinas marcados com peroxidase. Após novas lavagens, solução contendo cromógeno e substrato foi adicionado, deixando-se as placas por 30 minutos a temperatura ambiente e protegida da luz. A reação foi finalizada com ácido fosfórico (1:20) e a leitura realizada em leitor de ELISA (Molecular DevicesCorp.; Sunnyvale, CA, USA), utilizando filtro de 450nm. Os resultados foram calculados com auxílio do programa Softmax PRO (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, USA).

### **Ensaio *in vivo***

#### **Animais**

Camundongos BALB/c, machos, com idade entre 6-8 semanas provenientes do biotério do Laboratório de Parasitologia do Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML) da UFC, foram mantidos a temperatura ambiente, com ração comercial apropriada e água *ad libitum*. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da UFC (protocolo número 75/2011).

### **Toxicidade aguda e determinação da DL<sub>50</sub>**

Para avaliar a toxicidade aguda de EAEPa, foi utilizado o extrato na concentração inicial de 2000 mg/kg administrado por via oral (gavagem) a três camundongos previamente mantidos em jejum de três horas com água a vontade. A mortalidade foi monitorada por 14 dias. Finalizado este período, outros três camundongos receberam mais uma dose do extrato (2000 mg/Kg), que foi escolhida baseada no número de animais mortos ou não na etapa anterior. Uma vez que a mortalidade foi igual à obtida na etapa anterior, o teste foi finalizado e a DL<sub>50</sub> estimada (OECD, 2001).

### **Modelo experimental de infecção**

Os camundongos BALB/c foram infectados na derme da orelha direita com 20 µL na concentração de  $1 \times 10^7$  promastigotas (DE MOURA et al., 2005). O tamanho da lesão foi acompanhado semanalmente por 8 semanas de infecção. A espessura da lesão foi representada pela diferença entre a orelha direita infectada e a contralateral esquerda não infectada. Após 5 semanas de infecção, quando as lesões já eram aparentes, os animais foram tratados (COSTA et al., 2011).

### **Tratamento**

Os animais foram divididos em 03 grupos, contendo 05 animais por grupo. As drogas foram administradas diariamente por 15 dias. Utilizou-se uma dose de 250 mg de amostra vegetal administrada diariamente via intraperitoneal (i.p.) Um grupo foi tratado apenas com o veículo de solubilização (DMSO 1% v/v), uma vez ao dia, via i.p. A droga padrão Glucantime® foi administrada na dose de 20 mg/kg/dia, via intra-muscular (i.m.). Esta dose correspondeu a 1/25 a da DL50. Como amostra vegetal, foi utilizado o extrato acetato de etila *P.amboinicus*, uma vez que este apresentou o melhor desempenho nos testes *in vitro*.

## **Avaliação do efeito terapêutico da amostra vegetal**

### **Tamanho da lesão**

Durante a evolução do tratamento, foram realizadas medidas semanais do tamanho das lesões dos animais, conforme mencionado anteriormente.

### **Quantificação da carga parasitária no linfonodo regional**

A carga parasitária foi quantificada através da técnica de diluição limitante (TITUS et al., 1985), modificada por SILVA et al., (1994). Após o término do tratamento, os animais foram eutanasiados por inalação com halotano e os linfonodos poplíteos de drenagem das lesões e as patas (hamsters) ou orelhas infectadas (camundongos) foram isolados assepticamente, macerados em 1mL de Schneider e deixados em repouso por 5 minutos. A partir dessa suspensão de células, foram feitas diluições seriadas a 1:10 em meio Schneider suplementado. Cem microlitros destas diluições foram distribuídos em placas de cultura de 96 poços (Nunc, Germany), fundo chato, contendo meio ágar-sangue N.N.N., em sextuplicata (6 poços/diluição). As placas foram vedadas e incubadas por 3 semanas a 26°C. Foram observadas em microscópio óptico invertido (AusJena, Germany) de 3 em 3 dias para o registro das diluições que continham promastigotas. O número final de parasitos foi determinado, utilizando-se o programa ELIDA (TASWELL, 1984).

### **Análise histopatológica**

As orelhas infectadas de 5 animais de cada grupo foram fixadas em formalina tamponada neutra a 10%. Os tecidos foram montados em blocos de parafina, seccionados com espessura de 5 µm, e corados com hematoxilina e eosina para análise histológica. Avaliaram-se os seguintes parâmetros: infiltrados inflamatórios, necrose, polimorfonucleares, macrófagos vacuolados e presença de amastigotas. Cada parâmetro foi avaliado de acordo com a intensidade do evento através dos escores: 0 (ausência), 1+ (1-25% presença, raro), 2+ (presença de 25-50%; moderada), 3+ (>50%; intensa). A análise celular foi avaliada em cinco campos, utilizando o aumento de 1000 x.



## Isolamento de RNA e PCR em Tempo Real

A expressão de RNA mensageiro para COX-2, VEGF-a, TNF- $\alpha$  e TGF- $\beta$ , foi avaliada pela técnica de RT-PCR, realizada no Laboratório de Imunologia do Departamento de Farmácia da Universidade Federal do Ceará. A expressão foi determinada em amostras de linfonodo de drenagem de animais infectados tratados por 20 dias após a infecção na orelha com  $10^7$  promastigotas de *L. braziliensis*.

O RNA total foi extraído a partir de amostra de tecido de linfonodos utilizando Trizol Reagent (Invitrogen, Carlsbad, CA), conforme as recomendações do fabricante. O RNA total obtido foi dissolvido em água ultrapura tratada com dietilpirocarbonato (DEPC) e mantido a -80 °C até o uso. Aproximadamente 0,5 $\mu$ g de RNA total foi transcrito reversamente em DNA complementar (cDNA) com auxílio do kit High Capacity cDNA Reverse Transcription (Applied Biosystems, EUA) em volume final de 20 $\mu$ L, seguindo as recomendações do fabricante.

Para o desenho de primers específicos, as sequências de mRNA dos alvos estudados foram obtidas do NCBI e analisadas através do software OligoPerfect™ Designer (Thermo Fisher Scientific, EUA), obtendo-se os seguintes primers: COX-2, F:5'-AGAAGGAAATGGCTGCAGAA-3' e R:5'-GCTCGGCTTCCAGTATTGAG-3'; VEGF-a, F:5'-CCAGGAGGACCTTGTGTGAT-3' e R:5'-GGGAAGGGAAGATGAGGAAG-3'; TNF- $\alpha$ , F:5'-CTGGGACAGTGACCTGGACT-3' e R:5'-GCACCTCAGGGAAGAGTCTG-3'; TGF- $\beta$ , F:5'-TTGCTTCAGCTCCACAGAGA-3' e R:5'-TGGTTGTAGAGGGCAAGGAC-3';  $\beta$ -actina (housekeeping gene), F:5'-AGCCATGTACGTAGCCATCC-3' e R:5'-CTCTCAGCTGTGGTGGTGAA-3'.

As reações foram realizadas em um termociclador 2720 Thermal Cycler (Applied Biosystems, EUA) e os produtos de amplificação foram separados por eletroforese em gel de agarose 2,5% seguida por revelação com SYBR Safe (Invitrogen, EUA). A intensidade das bandas foi quantificada por análise densitométrica ChemiDoc MP (BIO-RAD, EUA) e Image Lab software (BIO-RAD, EUA).

## Análise estatística

Os dados obtidos estão apresentados como média aritmética  $\pm$  erro padrão (EP). O número de parasitos presentes nas lesões e linfonodos foram determinados pela análise do Qui-quadrado mínimo, aplicada à distribuição de Poisson, utilizando o programa ELIDA (TASWELL, 1984). Os resultados do estudo foram analisados pelo teste-*t* de Student ou

análise de variância (ANOVA), seguida por pós-teste de Tukey. Para as comparações entre múltiplos grupos foi realizado o teste one-way ANOVA, seguido pelo pós-teste Bonferroni. Todas as análises foram realizadas, utilizando-se o programa GraphPad Prism version 7.0 para Windows (GraphPad Software, San Diego, CA, USA). Em todos os testes utilizados, a significância mínima foi aceita quando  $p < 0,05$ .

## Resultados e discussão

*Plectranthus amboinicus* foi previamente demonstrado por ter ação antibacteriana (GONÇALVES et al., 2012; OLIVEIRA et al., 2013) e antileishmania (LIMA et al., 2014), o que nos encorajou a fracionar e estudar os extratos obtidos a partir dessa planta através de um estudo bioguiado, no qual, os extratos de *P. amboinicus* após a maceração com os solventes hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol, foram submetidos a um screening fitoquímico e avaliação de ação leishmanicida contra promastigotas de *L. braziliensis*. Após essa avaliação preliminar, decidiu-se aprofundar o estudo da ação do extrato acetato de etila *in vitro* e *in vivo*.

O screening fitoquímico do extrato acetato de etila obtido a partir das folhas frescas de *P. amboinicus* revelou a presença de heterosídeos flavônicos, digitálicos, taninos e esteroides. A análise para identificação de moléculas bioativas no extrato através de cromatografia líquida de ultra pressão (UPLC–QTOF–MS) (Figura 1) mostrou a presença de algumas moléculas conhecidas, nomeadamente: ácido quinico, ácido protocatecuico, ácido cafeico, cumaroilmalato, timoquinona, ácido siringico, ácido rosmarinico, luteolina, apigenina, tricine e cirsimaritina (Tabela 1).

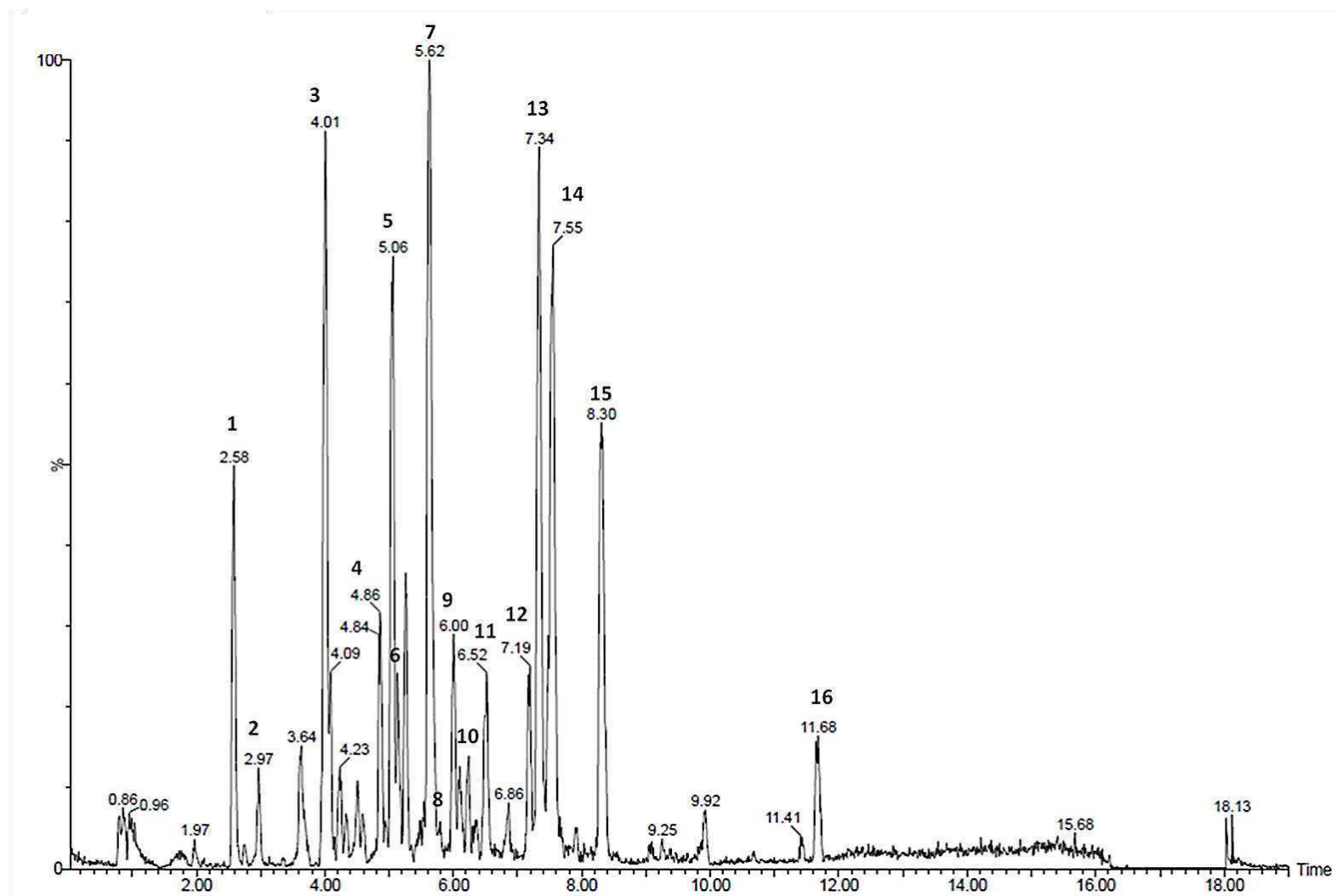
Figura 1. Cromatograma do extrato acetato de etila de *Plectranthus amboinicus* obtido por UPLC

Tabela 1. Picos identificados no extrato acetato de etila das folhas de *P. amboinicus* por HPLC-ESI-MS.

Pico no.	Rt min	[M-H] <sup>+</sup> Observado	[M-H] <sup>+</sup> Calculado	Íons Produto (MS/MS)	Formula Empirica	Ppm (erro)	Nome	Referencias
1	2.58	191.0553	191.0556	173.0469	C <sub>7</sub> H <sub>11</sub> O <sub>6</sub>	1.6	Ácido quinico	(HOSSAIN et., 2010)
2	2.97	153.0193	153.0188	109.0285	C <sub>7</sub> H <sub>5</sub> O <sub>4</sub>	3.3	Ácido protocatecuico	(HOSSAIN et., 2010)
3	4.01	179.0344	179.0344	161.0487, 135.0428	C <sub>9</sub> H <sub>7</sub> O <sub>4</sub>	0.0	Ácido cafeico	(HOSSAIN et., 2010)
4	4.86	279.0491	279.0505	163.0382, 119.0490	C <sub>13</sub> H <sub>11</sub> O <sub>7</sub>	5.0	Coumaroilmalato	(HARBAUM et al., 2007)
5	5.04	165.0915	165.0916	165.0915, 369.1552	C <sub>10</sub> H <sub>13</sub> O <sub>2</sub>	0.6	Timoquinona	(YUAN-SIAo et al., 2014; ARUMUGAM et al., 2016)
6	5.25	369.1542	369.1549	169.0887	C <sub>18</sub> H <sub>25</sub> O <sub>8</sub>	2.1	N.i 1	-
7	5.62	197.0457	197.0450	197.0457, 161.0219	C <sub>9</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	3.6	Ácido Siringico	(HOSSAIN et., 2010)
8	5.67	359.0758	359.0767	197.0428, 161.0227,179.0337	C <sub>18</sub> H <sub>15</sub> O <sub>8</sub>	2.5	Ácido Rosmarínico	(EL- HAWARY 2012; WANG et al., 2013)
9	6.00	373.1495	373.1499	329.1596, 269.1529, 225.1479	C <sub>17</sub> H <sub>25</sub> O <sub>9</sub>	2.1	N.i 2	-
10	6.24	421.2066	421.2074	289.1648, 161.0386	C <sub>19</sub> H <sub>33</sub> O <sub>10</sub>	0.4	N.i 3	-
11	6,52	285.0400	285.0399	151.0019, 133.0307	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>6</sub>	0.4	Luteolina	(EL- HAWARY 2012; KUNFENG et al., 2011; ARUMUGAM et al., 2016)
12	7.19	269.0461	269.0450	117.0335	C <sub>15</sub> H <sub>9</sub> O <sub>5</sub>	4.1	Apigenina	(ARUMUGAM et al., 2016)
13	7.34	795.3092	795.3075	491.1003, 353.1582, 149.0957	C <sub>38</sub> H <sub>51</sub> O <sub>18</sub>	0.8	N.i 4	-
14	7.55	329.0661	329.0661	299.0196, 330.0742	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> O <sub>7</sub>	0.0	Tricine	(BOTTCHEr et al., 2013)
15	8,30	313.0699	313.0712	313.0699, 298.0498, 283.0231	C <sub>17</sub> H <sub>13</sub> O <sub>6</sub>	4.2	Cirsimaritin	(HOSSAIN et., 2010)
16	11.66	277.2121	277.2168	277.2121; 253.0910;	C <sub>18</sub> H <sub>29</sub> O <sub>2</sub>	17	N.i 5	-

O interesse por medicamentos isolados de plantas tem focado no isolamento de compostos bioativos e na compreensão de sua importância farmacológica. No entanto, o perfil químico e o padrão de constituintes bioativos em diferentes partes da planta e seu teor de óleo essencial variam dependendo de vários parâmetros, como características geográficas, clima e diferentes estágios de coleta do material vegetal. Além disso, o método de extração e identificação também pode levar a variações na composição fitoquímica (SWAMY & SINNIHAH, 2015).

Atualmente, existem poucos relatos de isolamento e atividade dos compostos isolados de *P. amboinicus*. Portanto, a correta identificação, isolamento e quantificação de fitocompostos é necessária para entender sua importância farmacológica e biológica. É relatado que *P. amboinicus* contém várias classes de fitoquímicos incluindo monoterpênicos, diterpenóides, triterpenóides, sesquiterpenóides, fenólicos, flavonóides e ésteres (KLEIN et al., 2009; CHAN-BACAB e PEÑA RODRIGUEZ, 2001), dentre esses, a literatura revisada revelou a presença de 30 compostos não voláteis identificados em extratos de *P. amboinicus* (ARUMUGAM et al., 2016).

Em um estudo conduzido através de HPLC, com o extrato acetato de etila das folhas de *P. amboinicus* coletadas no Egito, relatou a identificação de oito compostos com base nos espectros de UV, RMN e seus dados físicos, estes compostos isolados foram identificados como: 5,41-Dihidroxi-3,7-dimetoxi flavona (3-metoxi genkwanin), 5,41 dihidroxi-6,7-dimetoxi flavona (Crisimaritina), ácido p-cumárico (ácido hidróxi cinâmico), ácido cafeico, 3,5,7,31,41-Pentahidroxi flavanona (Taxifolina), ácido rosmarínico, apigenina e 5-O-Metil-luteolina (EL-HAWARY et al., 2012).

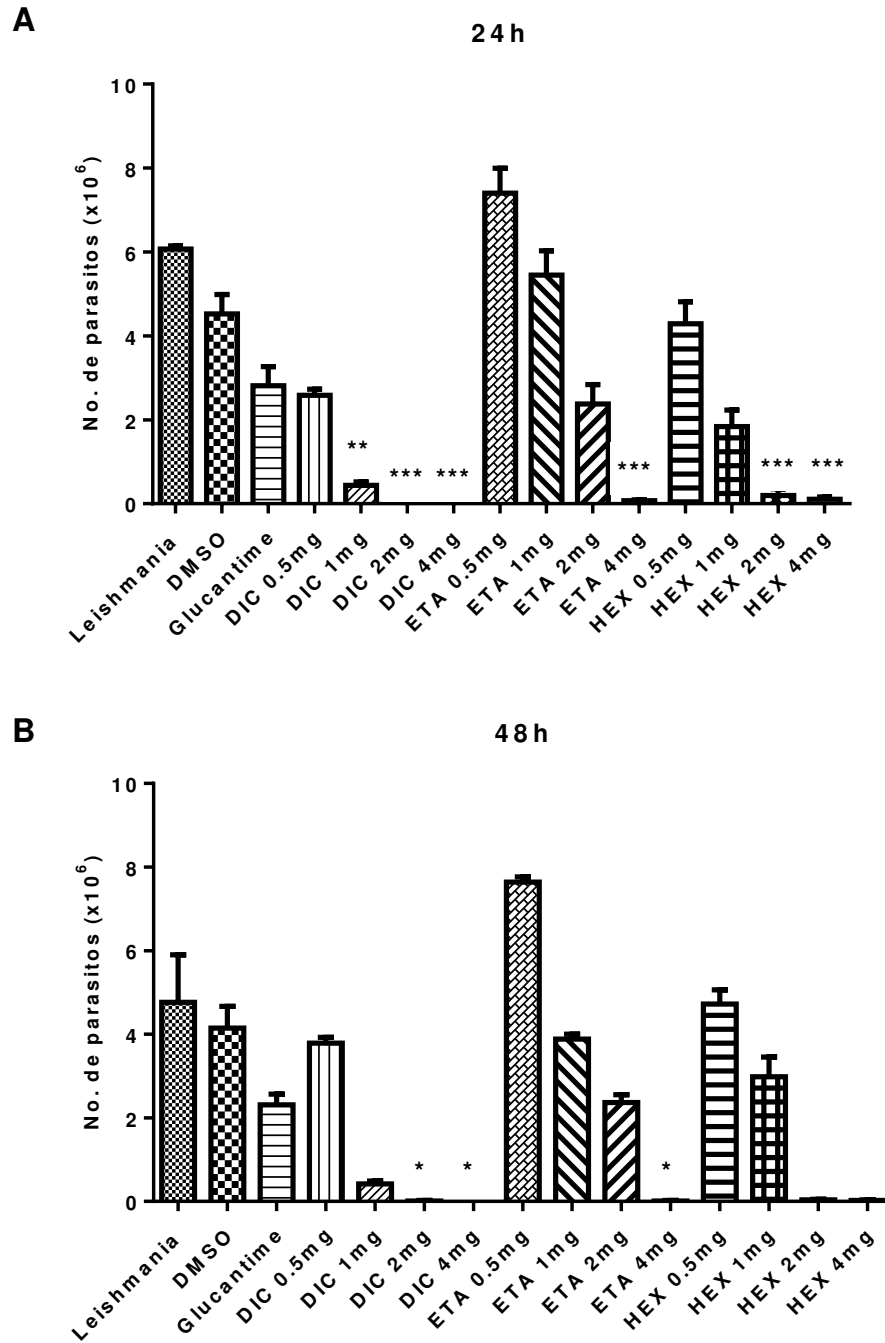
Nesse mesmo estudo, também foram identificados taninos nos extratos de raízes, folha e caule. A análise por cromatografia líquida de ultra performance (UPLC)-MS identificou a presença de ácido rosmarínico, crisoiol, ácido cafeico e ácido p-cumárico nas frações de acetato de etila de caule e raízes. Os compostos Eriodictiol, Luteolina e Quercetina foram encontrados apenas nas frações de acetato de etila do caule (EL-HAWARY et al., 2012). Bhatt et al. (2013) analisaram os extratos metanólicos do caule de *P. amboinicus* e este estudo revelou a existência de conteúdo fenólico total, taninos condensados e flavonóides totais. Além disso, a análise por HPLC do extrato confirmou a ocorrência de polifenóis bioativos como ácido rosmarínico, rutina, ácido cafeico, ácido gálico, ácido p-cumárico e quercetina.

Um estudo prévio realizado com folhas de *P. amboinicus* por Kumaran e Karunakaran (2006) relatou que o ácido rosmarínico, ácido cafeico e ácido clorogênico são as principais moléculas antioxidantes nessa espécie. El-hawary et al., (2012) mostrou ação antiinflamatória do extrato acetato de etila de *P. amboinicus* e Chiu et al., (2012), associou essa ação ao ácido rosmarínico.

Poucos estudos mais aprofundados sobre a atividade antileishmania dessas classes de compostos químicos naturais têm sido conduzidos. Entre esses, um estudo apontou que flavonóides como a luteolina, comum na dieta humana, apresentavam efeito antileishmanicida promissor (MITTRA et al., 2000).

Para verificar a ação leishmanicida dos extratos diclorometano, acetato de etila e etanol de *P. amboinicus*, promastigotas de *L. braziliensis* foram cultivadas em meio Schneider suplementado, juntamente com as concentrações dos extratos, controle de diluição (DMSO 1%) e controle de tratamento (Glucantime). Observou-se que mesmo em baixas concentrações, o extrato acetato de etila de *P. amboinicus* (EAEPA) conseguiu reduzir a quantidade de promastigotas, demonstrando melhor desempenho na ação contra estas formas, decidiu-se, a partir destes resultados, continuar os testes, utilizando-se apenas este extrato (Gráfico 1A e B e 2 A e B).

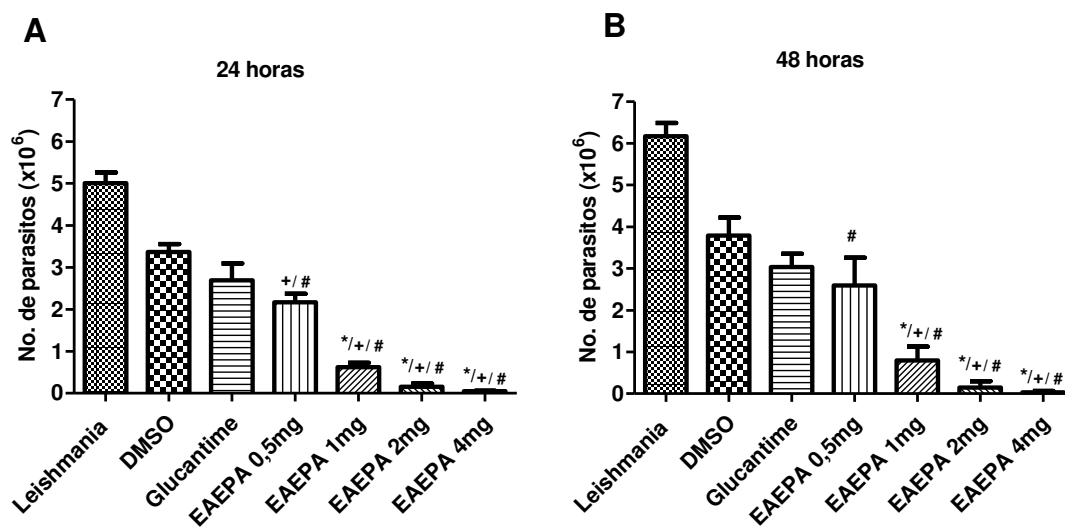
Gráfico 1- Ação dos extratos Diclorometano, Etanólico e Hexano das folhas de *Plectranthus amboinicus* sobre as formas promastigotas de *Leishmania braziliensis*.



DIC: representa o extrato diclorometano; ETA: Extrato Etanol; HEX: Extrato hexano. As barras representam a média  $\pm$  DP de três experimentos independentes feitos em sextuplicata; a análise estatística foi conduzida através de One-way ANOVA com pós-teste Tukey. Todos os extratos foram comparados com o Glucantime®, medicamento padrão utilizado para o tratamento. A significância está representada por \*:p<0.05;\*\*p<0.01;\*\*\*:p<0.001.

A concentração 0,5 mg/mL do EAEPa, após 24 horas de tratamento, apresentou 67,65% ( $2,2 \times 10^6$ ) de promastigotas viáveis quando comparada ao controle de diluição (DMSO); a concentração 1mg/mL apresentou 18,39% ( $0,62 \times 10^6$ ); 2mg/mL apresentou 4,45% ( $0,16 \times 10^6$ ); 4mg/mL apresentou 1,48% ( $0,05 \times 10^6$ ) e o controle de tratamento, Glucantime, 56% ( $2,8 \times 10^6$ ). As concentrações 1; 2 e 4 mg/mL apresentaram resultados significativamente melhores do que o medicamento padrão de tratamento Glucantime ( $p < 0,05$ ). Os resultados obtidos foram também melhores do que os obtidos com óleo essencial da mesma planta na concentração de 2,5%, o qual só obteve diferença significativa do tratamento com Glucantime, após 48h de tratamento (LIMA et al., 2013a). Os melhores efeitos do extrato acetato de etila demonstraram um percentual de inibição  $\geq 50\%$  nas concentrações a partir de 1 mg/mL, dado importante, visto que, uma inibição neste nível com uma concentração  $\leq 1000 \mu\text{g/mL}$  é considerado clinicamente relevante (ROSAS et al., 2007).

Gráfico 2- Ação do extrato acetato de etila de *Plectranthus amboinicus* (EAEPa) e droga de referência, Glucantime® sobre formas promastigotas de *L. braziliensis*.



2A. EAEPa nas concentrações de 0,5; 1; 2; 4mg/mL, no tempo de exposição de 24 horas. 2B- no tempo de exposição de 48 horas. As barras representam a média  $\pm$  DP de três experimentos independentes feitos em sextuplicata; a análise estatística foi conduzida através de One-way ANOVA com pós-teste Tukey. # indicam diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações de EAEPa em relação ao controle que é considerado como 100% de promastigotas vivas; \* indicam diferenças estatisticamente significativas entre as concentrações de EAEPa em relação ao Glucantime®; + indicam diferenças estatisticamente significativas em relação ao veículo de diluição (DMSO 1%) ( $p < 0,05$ ).



A fim de verificar se EAEPA era seletivo para lisar apenas as amastigotas sem causar danos à célula hospedeira, foi avaliada a citotoxicidade e através desses resultados, foi possível estabelecer as concentrações a serem testadas nos demais ensaios *in vitro*. Os resultados mostraram que EAEPA apresentou efeito tóxico a partir de 0,125mg/mL, baseado no controle contendo somente macrófagos (Tabela 5). Foram consideradas não citotóxicas concentrações que produziram  $\leq 20\%$  de morte celular ( $\geq 80\%$  de células viáveis) (TEIXEIRA, 2001). Os resultados obtidos para a citotoxicidade divergem de estudos anteriores que apontaram baixa citotoxicidade do extrato etanólico de *P. amboinicus* em uma concentração mais elevada do que no presente estudo (10mg/mL) com inibição do crescimento celular de 19,19% (LIMA 2013). E o óleo essencial não apresentou citotoxicidade nas concentrações de 0,125 a 4mg/mL em macrófagos RAW 264.7 (LIMA et al., 2013). No entanto, estes resultados podem ser justificados por que se trata de formas de extrações diferentes da espécie *P. amboinicus* e conseqüentemente apresentam alguns metabólitos secundários distintos.

Tabela 2- Efeito citotóxico do extrato acetato de etila de *Plectranthus amboinicus* em macrófagos peritoneais murinos.

<b>Efeito citotóxico de EAEPA em macrófagos peritoneais murinos</b>			
<b>Tratamento</b>	<b>Concentração (mg/mL)</b>	<b>% de Células viáveis</b>	<b>Células viáveis (x10<sup>6</sup>)</b>
<b>M<math>\phi</math></b>	-	100	1,16 $\pm$ 0,11
<b>DMSO</b>	1%	74	0,86 $\pm$ 0,20
<b>EAEPA</b>	0,016	100	1,46 $\pm$ 0,23
	0,03	100	1,23 $\pm$ 0,55
	0,06	82,7	0,96 $\pm$ 0,41
	0,125	57	0,66 $\pm$ 0,11
	0,25	54	0,63 $\pm$ 0,23

Os valores representam a média aritmética de 3 ensaios  $\pm$  D.P.

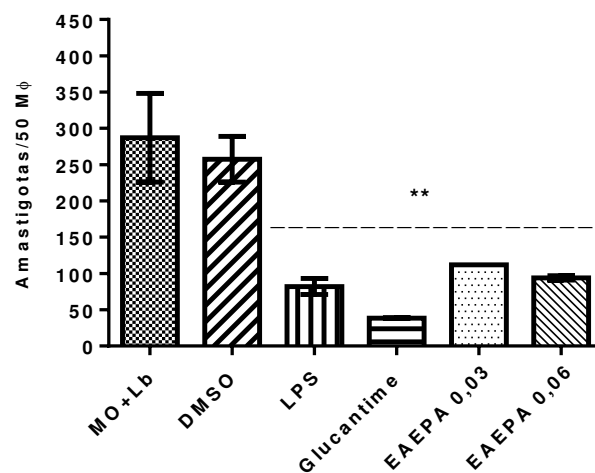
A partir desses resultados, foi decidido utilizar concentrações das amostras vegetais abaixo e igual a 0,06 mg/mL.

### **Avaliação da infecção de macrófagos *in vitro***

As formas amastigotas residem nos fagolisossomos de macrófagos, portanto os compostos ativos devem ser capazes de atravessar as membranas da célula hospedeira e atingir o interior do vacúolo fagolisossomal. Para avaliar se EAEPA era capaz de atuar sobre macrófagos infectados com as formas amastigotas, macrófagos intraperitoneais de camundongos Swiss foram infectados com formas promastigotas de *L. braziliensis* (10 parasitos:1 macrófago) e tratados com EAEPA nas concentrações de 0,03 e 0,06mg/mL e Glucantime na concentração de 32mg/mL por até 24h.

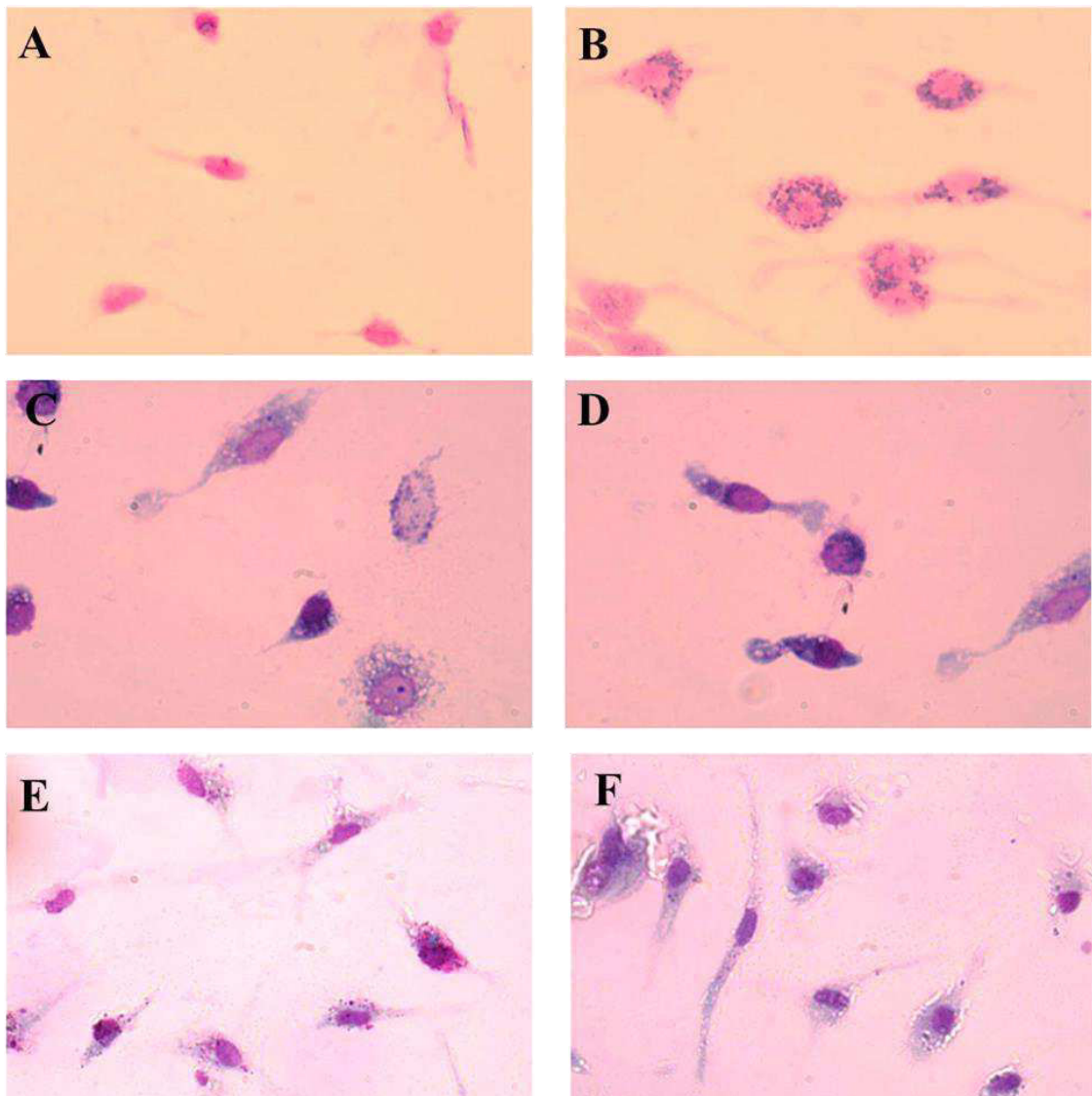
A observação das lâminas obtidas (Figura 2) mostrou que, após 24h, o tratamento com EAEPa, nas duas concentrações não citotóxicas testadas, resultou em uma redução estatisticamente significativa da carga parasitária, 60 e 67,24%, respectivamente ( $p < 0,01$ ), quando comparado com o controle não tratado  $M\phi + Lb$  (Gráfico 3). O tratamento com Glucantime apresentou redução de carga parasitária de 86,58% quando comparado ao mesmo controle ( $p < 0,01$ ). Estes resultados sugerem que o tratamento de macrófagos murinos com EAEPa é capaz de reduzir a carga parasitária intracelular sem provocar alterações nos macrófagos.

Gráfico 3- Avaliação da carga parasitária em macrófagos murinos infectados com *Leishmania braziliensis* tratados com extrato acetato de etila de *Plectranthus amboinicus*.



As barras representam a média  $\pm$  erro padrão de três experimentos independentes feitos em duplicata. \*\* indicam diferenças estatisticamente significativas das substâncias testadas em relação ao controle Macrófago infectado com *L. braziliensis* que é considerado como 100% de amastigotas ( $p < 0,01$ ).

Figura 2- Macrófagos murinos infectados com *Leishmania braziliensis* tratados com extrato acetato de etila *Plectranthus amboinicus* observados em microscopia óptica aumento 1000x. A. Macrófagos não infectados; B. Macrófagos infectados com *L. braziliensis*; C. Macrófagos infectados com *L. braziliensis* tratados com DMSO 1%; D. Macrófagos infectados com *L. braziliensis* tratados com Glucantime; E. Macrófagos infectados com *L. braziliensis* tratados com EAEPA a 0,03mg/mL; F. Macrófagos infectados com *L. braziliensis* tratados com EAEPA 0,06mg/mL.



### Produção de citocinas

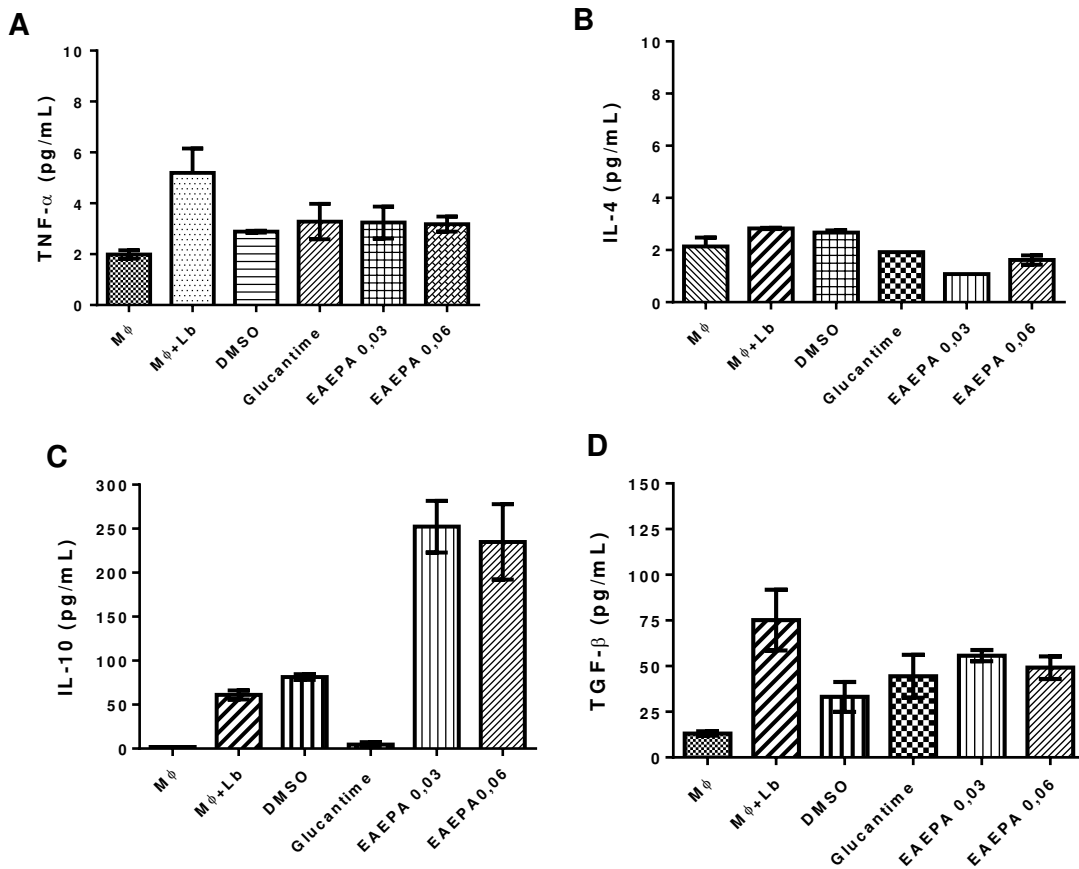
A produção de TNF- $\alpha$  pelos macrófagos parasitados tratados com Glucantime, Anfotericina e EAEPA foi menor quando comparada com os macrófagos parasitados não

tratados. Esta produção diminuiu independente da concentração de EAEPa utilizada (GRÁFICO 4A).

Os resultados mostraram que os grupos tratados com EAEPa apresentaram uma baixa produção de IL-4. Esses resultados foram semelhantes ao grupo tratado com Glucantime (GRÁFICO 4B). O tratamento com EAEPa induziu uma alta produção de IL-10 nas concentrações testadas (0,03; 0,06 mg/mL) (GRÁFICO 4C).

As dosagens de TGF- $\beta$  mostraram que os grupos tratados com as concentrações de EAEPa apresentaram discreta produção de TGF- $\beta$  quando comparada ao grupo não tratado e similar ao grupo tratado com Glucantime (Gráfico 4D).

Gráfico 4- Concentração de citocinas (TNF- $\alpha$ , IL-4, IL-10, TGF- $\beta$ ) em macrófagos murinos infectados com *Leishmania braziliensis* tratados com EAEPa.



Os dados representam a média aritmética  $\pm$  erro padrão

O controle da leishmaniose cutânea humana está associado com uma resposta imunológica Th1 específica contra o parasita. A liberação de IL-12 por macrófagos e células dendríticas, leva à produção de IFN- $\gamma$  por células NK e diferenciação de células Th0 em células Th1, que também produzirão IFN- $\gamma$  que irá fornecer um estímulo chave para o desenvolvimento da resistência de macrófagos ao parasito e a produção de espécies reativas do oxigênio e nitrogênio pelos macrófagos ativados (ANDRADE et al., 2014; GIUDICE et al., 2007). Os macrófagos são células fagocíticas que desempenham um papel crítico na resposta imune do hospedeiro à infecção microbiana. Eles desempenham um papel crucial na resposta imunológica protetora inicial contra a infecção por *Leishmania* (KOUTSONI et al., 2014; LIU; UZONNA, 2012). Durante as interações patógeno-hospedeiro, a produção inicial de citocinas pode influenciar tanto nas respostas imune inata quanto adaptativa.

A síntese de IL-4 foi menor em células infectadas que foram tratadas com EAEPA em comparação com macrófagos infectados e não tratados, resultado que confirma um controle da parasitemia mediada por uma resposta imunológica Th1. Estas citocinas são conhecidas como supressoras da resposta imune e também por estimular a resposta Th2 que inibe os mecanismos de morte *Leishmania sp.* induzidos por macrófagos levando à progressão da doença (OLIVEIRA et al., 2014). A IL-4 é uma citocina "central" que pode ser crítica para a produção de outras citocinas, como IL-5 e IL-10; portanto, por consequência, ambas podem estar diminuídas se IL-4 for inibida. Os doentes infectados com *Leishmania* apresentam níveis elevados de IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, TNF e IL-17 (ESPIR et al., 2014).

A produção de TNF foi elevada em macrófagos infectados, e o tratamento com EAEPA diminuiu os níveis desta citocinas em 24 h. Assim, EAEPA inverteu a elevação de TNF que foram promovidos pela infecção (Figura 4A). Os níveis de TNF elevados em macrófagos infectados por *Leishmania* não tratados corroboram com outro estudo que relatou uma relação entre o aumento do TNF e a susceptibilidade à infecção por *L. (L.) amazonensis* através da indução de infecção parasitária persistente e lesão tecidual (DUQUE et al., 2014). A diminuição de TNF induzida por EAEPA (0,06mg/mL) pode contribuir para a redução dos danos locais causados pelo recrutamento de neutrófilos antes de iniciar o controle da infecção.

Majumder et al., (2012) observaram que em um tratamento com camundongos BALB/c infectados com *L. donovani*, o hospedeiro apresentou uma forte resposta Th1 protetora com aumento na produção de IFN- $\gamma$ , acompanhado de diminuição de células Treg

imunossupressoras como TGF- $\beta$  e IL-10, sugerindo um papel sobre as funções reguladoras das células T e células dendríticas, que pode ser útil no combate à patogênese induzida por *Leishmania*. Resultado similar foi encontrado em nosso estudo em se tratando de TGF- $\beta$ , no entanto IL-10 apresentou-se aumentada após tratamento com EAEPA.

Carvalho et al., (2012) e Boaventura et al., (2006) relataram em seus estudos que IL-10 partilha com TGF- $\beta$  os seus efeitos inibitórios sobre a atividade leishmanicida dos fagócitos e sobre a resposta inflamatória bem como a diferenciação Th1/Th2. Na leishmaniose humana, a IL-10 é descrita como uma “espada de dois gumes”, sendo importante para evitar a exacerbação da lesão, mas favorecendo o crescimento e impedindo a eliminação completa dos parasitos. Mecanismo este, que explica os altos níveis de IL-10 encontrados após o tratamento com EAEPA.

Fitoquímicos incluindo os da família Lamiaceae, podem estimular citocinas que medeiam a resposta imunológica celular protetora contra patógenos intracelulares e outros agentes (GAZIM et al., 2011; OKEM et al., 2012) Os efeitos imunomoduladores e antileishmania que foram induzidos por EAEPA podem ser atribuídos à sua complexa mistura de compostos. Diversos compostos químicos, isolados de extratos vegetais, têm comprovada atividade leishmanicida sobre formas promastigotas e/ou amastigotas de *Leishmania* em ensaios *in vitro*. Destes, tem-se relato da atividade leishmanicida de aminoglicosteróides e aminosteróides (KAM et al., 1997) e flavonóides (ARAÚJO et al., 1998) encontrados também em EAEPA.

### **Ensaio *in vivo* em modelo de infecção em orelha com *L. (V.) braziliensis* em Camundongos BALB/c**

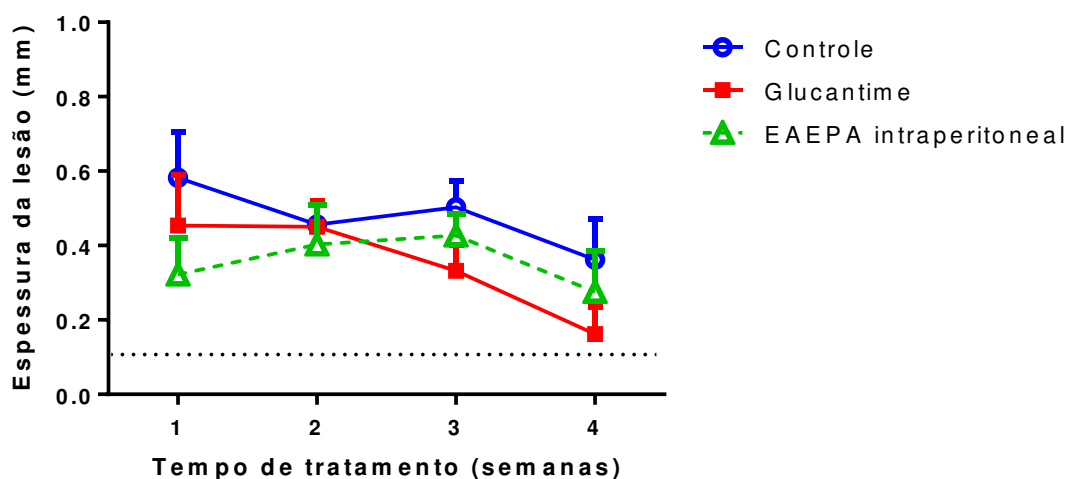
#### **Avaliação da toxicidade aguda**

A dose de 2000 mg/kg do extrato acetato de etila de *P. amboinicus* não levou a morte de nenhum dos três animais em nenhuma das duas etapas propostas, conforme proposição da OECD. De acordo com o esquema proposto, a DL50 foi estimada como sendo de > 5000 mg/kg.

### Evolução das lesões e carga parasitária de linfonodo de drenagem em camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*

Para avaliar a atividade leishmanicida *in vivo* do extrato acetato de etila de *Plectranthus amboinicus*, camundongos BALB/c foram infectados na derme da orelha direita com 20 $\mu$ L na concentração de  $1 \times 10^7$  promastigotas (DE MOURA et al., 2005). Para avaliar a cinética das lesões, foram realizadas medidas semanais das orelhas infectadas e não infectadas, sendo acompanhadas até a 8ª semana de infecção. Nos três grupos avaliados, as lesões foram aumentando gradativamente e na 5ª semana de infecção, quando a maioria das lesões já apresentavam ulcerações, foram iniciados os tratamentos, realizados por 15 dias seguidos. Os animais do grupo tratado com 250mg/Kg/dia de EAEPa via intraperitoneal (i.p) apresentaram lesões de  $0,27\text{mm} \pm 0,24\text{mm}$  no final do estudo, o que representa um redução de 18%, quando comparado ao grupo controle não tratado  $0,33\text{mm} \pm 0,23\text{mm}$ . Nos animais que receberam o tratamento com Glucantime a redução foi de 66,6%,  $0,116\text{mm} \pm 0,13\text{mm}$ . A linha tracejada representa a espessura da orelha de camundongos BALB/c não infectados (Gráfico 5).

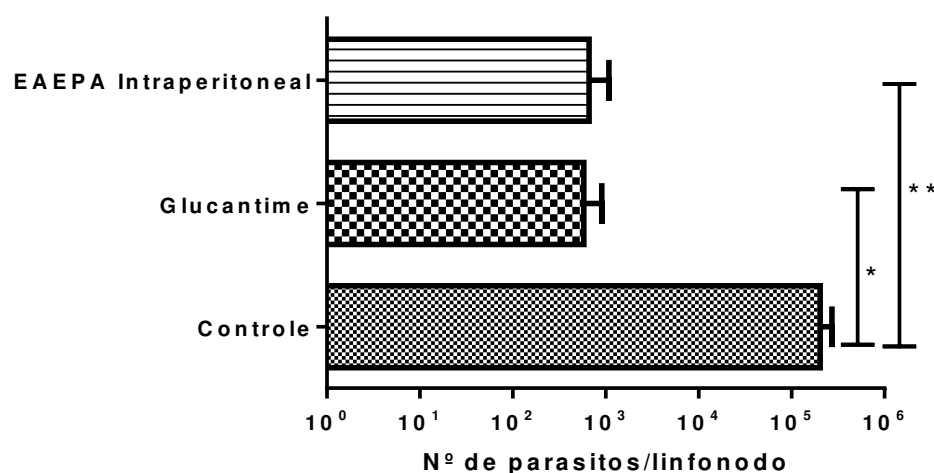
Gráfico 5- Evolução das lesões em camundongos BALB/c após infecção com *L. braziliensis* e tratamento com extrato acetato de etila de *P. amboinicus* via intraperitoneal por três semanas.



Camundongos BALB/c foram infectados com  $10^7$  promastigotas de *L. braziliensis* na orelha direita e acompanhados até 8ª semana de infecção. A espessura da lesão foi avaliada com medições a cada 7 dias. Os dados representam as médias aritméticas  $\pm$  EP de 6 animais por cada grupo. A linha tracejada significa a espessura de orelhas de camundongos BALB/c não infectados.

No linfonodo, após 8 semanas de infecção, foi possível observar uma significativa redução da carga parasitária no grupo tratado com EAEPA intraperitoneal ( $6,63 \times 10^2 \pm 4,24 \times 10^2$ ) quando comparado ao grupo controle não tratado ( $2,02 \times 10^5 \pm 6,9 \times 10^4$ ) ( $p < 0,001$ ); e semelhante ao grupo tratado com Glucantime que também apresentou redução da carga parasitária ( $5,8 \times 10^2 \pm 3,25 \times 10^2$ ) quando comparado ao controle ( $p < 0,01$ ) (Gráfico 6).

Gráfico 6 - Carga parasitária no linfonodo de camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis* e tratados com extrato acetato de etila de *P.amboinicus*.



Número de parasitos em camundongos BALB/c inoculados na orelha direita com  $10^7$  promastigotas de *L. braziliensis* e divididos em três grupos (não tratado: Controle; tratado com Glucantime; tratado com EAEPA i.p. Grupos de animais ( $n=6$ /grupo) foram eutanasiados após três semanas de tratamento. Os resultados são expressos pela média aritmética  $\pm$  erro padrão. Os grupos de tratamento foram comparados ao grupo controle. \*  $p < 0,01$ , \*\* $p < 0,001$ .

Buscou-se através desse estudo, avaliar o efeito de EAEPA, em camundongos BALB/c infectados com *L. braziliensis*, utilizando um modelo experimental murino diferente do modelo tradicional de infecção na pata. Neste modelo, os parasitos são inoculados na derme da orelha, o que mimetiza melhor a infecção humana, por reproduzir de maneira mais evidente os aspectos da infecção natural tais como, a auto cura, a presença de lesão ulcerada, disseminação do parasito para os linfonodos e desenvolvimento de uma resposta imunológica mista Th1/Th2, caracterizada pela presença de células secretoras de IFN- $\gamma$ , IL-4 e IL-10, e



ausência de dominância de resposta Th2 observada em infecções por *L. major* em animais susceptíveis (DE MOURA et al., 2005). Outro aspecto relevante da inoculação do parasita na derme do camundongo está no fato de que esse é o local onde a infecção ocorre naturalmente. Além disso, a pele possui células e estruturas especializadas e mais bem adaptadas para responder aos ataques por microrganismos.

Os resultados encontrados no ensaio *in vitro*, foram comprovados nos experimentos *in vivo* do tratamento com EAEPa em modelo de infecção na orelha de camundongos BALB/c, principalmente tratando-se da redução da carga parasitária no linfonodo de drenagem. Lima et al., (2013) em seu estudo sobre a ação do óleo essencial de *P. amboinicus* não conseguiu reproduzir os resultados *in vitro* em modelo *in vivo* de infecção por *L. braziliensis* em modelo de pata em camundongos BALB/c.

Em relação ao tamanho das lesões, nenhuma diferença foi encontrada ao final do tratamento quando comparado os animais tratados com o material vegetal e os animais não tratados (Gráfico 5). Este fato pode estar relacionado com uma cura espontânea das lesões com disseminação de parasito para o linfonodo de drenagem.

Childs et al., (1984) aponta o modelo de infecção com camundongos BALB/c como o mais suscetível à infecção, embora *L. braziliensis* não cause, nessa linhagem, lesões severas ou de longa duração. Um estudo que buscou analisar o curso do desenvolvimento da lesão de camundongos BALB/c inoculados com cepas de *L. braziliensis* na pata, relatou a cura da lesão e disseminação do parasito para o linfonodo de drenagem, após 30 dias de infecção (OLIVEIRA & BARRAL-NETTO 2005), dados estes que diferiram do presente estudo em relação ao tempo de cura da lesão. Neste, o qual a infecção foi na orelha, foi observada a cura espontânea da lesão após 60 dias de infecção. Já o trabalho de Viana (2013) avaliou durante 90 dias a infecção de camundongos BALB/c na pata e relatou que os parasitos desapareceram gradativamente do sítio de inoculação inicial, mas que a carga parasitária persistiu no linfonodo de drenagem mesmo após 90 dias de infecção, indicando que são capazes de continuar se multiplicando neste local, apesar da resolução da lesão. O linfonodo é um importante sítio de proliferação do parasito durante a infecção por *Leishmania*, e um dos primeiros órgãos a ser afetado durante a disseminação sistêmica do parasito (MOLL et al., 1995).

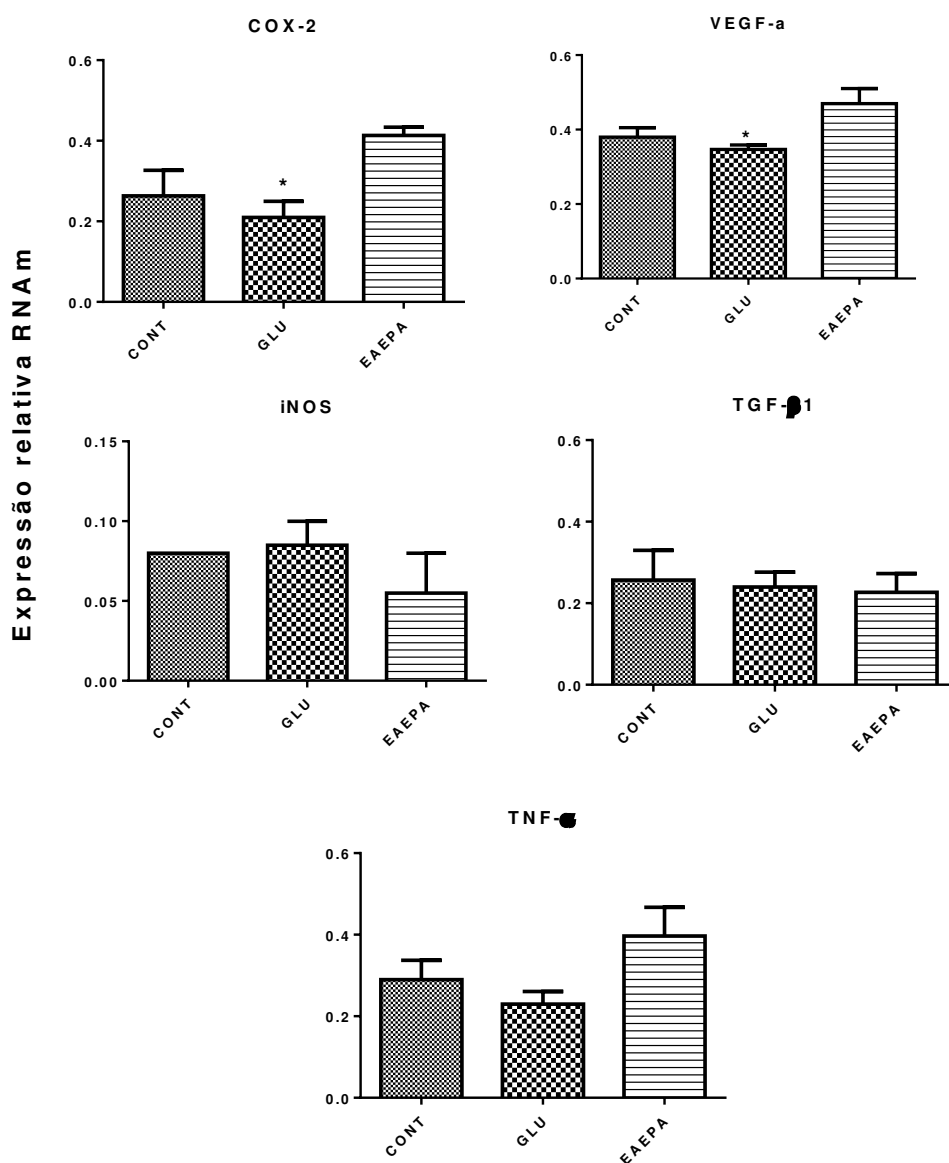
No trabalho de Viana et al., (2015) foi testada a ação de quinonas obtidas a partir da espécie *Auxemma oncocalyx*, administrada intraperitonealmente em camundongos infectados

com *L. braziliensis*. Neste, foi observada redução de 65% no tamanho das lesões, mas não houve diminuição da carga parasitária no linfonodo de drenagem. A diminuição da espessura da lesão foi então atribuída a uma ação anti-inflamatória.

### **Perfil da expressão gênica de mediadores inflamatórios em linfonodos infectados com *L. braziliensis***

Para estudar a expressão de citocinas, enzimas e proteínas envolvidas na infecção por *L. braziliensis*, linfonodos de camundongos infectados por *L. braziliensis* foram processadas para a extração e quantificação de RNAm através de PCR.

Gráfico 7- Expressão relativa de RNAm de citocinas em linfonodos de camundongos BALB/c infectados por *L. braziliensis*.



\*representa diferença estatística entre o grupo tratado com Glucantime e o grupo tratado com extrato acetato de etila de *P. amboinicus* ( $p < 0,05$ ).

A expressão de iNOS foi menor que os demais produtos após o tratamento com EAEPa. Por outro lado, a expressão de VEGF e COX-2 aumentou após o tratamento com EAEPa quando comparado ao controle e com tratamento com Glucantime ( $p < 0,05$ ).

Em relação às citocinas, a expressão de TNF- $\alpha$  aumentou após o tratamento com EAEPa e a de TGF- $\beta$  diminuiu não significativamente quando comparado ao controle, e em

relação ao tratamento com Glucantime ambos seguiram padrão de expressão semelhante (Gráfico 7).

A sobrevivência do parasito dentro de macrófagos depende de diversos fatores, dentre os quais se destaca a L-arginina, substrato de duas enzimas que desempenham papéis opostos: a óxido nítrico sintase (iNOS) e a arginase. A iNOS é induzida por citocinas Th1 e oxida a L-arginina em óxido nítrico (NO), responsável pela morte do parasita dentro da célula. As citocinas do perfil Th2 induzem a expressão de arginase, que ao degradar a L-arginina, leva a produção de poliaminas necessárias à sobrevivência das amastigotas dentro dos macrófagos. Dessa forma esta enzima possui um papel importante na manutenção da infecção por *Leishmania* (DAS et al., 2010; WANASEN & SOONG et al., 2008).

Sabe-se também que a produção de reativos de oxigênio e de nitrogênio, por macrófagos ativados por IFN- $\gamma$ , é inibida na presença de citocinas como TGF- $\beta$ , IL-4, IL-13 e IL-10, indicando que a diminuição na produção de citocinas do tipo Th2 pode ser importante para o desenvolvimento de uma resposta imune adquirida (BOGDAN et al., 2007). Este não parece ter sido o mecanismo de morte do parasito após o tratamento com EAIPA, visto que a presença de TGF- $\beta$  após o tratamento pode ter influenciado na diminuição de iNOS, e conseqüentemente, a produção de NO. Em contrapartida, Gomes et al., (2003) observou que macrófagos de camundongos CBA/J tratados com IFN- $\gamma$  apresentaram infecção reduzida por *L. major* quando comparados com macrófagos infectados com *L. amazonensis*; e essa redução na infecção por *L. major* foi associada à produção de TNF- $\alpha$ . Podendo esse ter sido o mecanismo de inibição de *L. braziliensis* após tratamento com EAIPA.

Observou-se tendência de maior expressão de TNF- $\alpha$  após o tratamento com EAIPA, o que aponta esta citocina como implicada na manutenção de uma resposta pró-inflamatória no sítio de infecção. Liew et al., (1990) atestam a importância de TNF- $\alpha$ , produzida por macrófagos e linfócitos, no controle de infecções por *Leishmania spp.* Esta citocina é importante para o controle da infecção principalmente durante a fase aguda, como se observou em estudo com camundongos BALB/c knockout infectados por *L. braziliensis*, que apresentavam número aumentado de parasitos na pele, linfonodos e baço (ROCHA et al., 2007). A alta produção de TNF- $\alpha$  em células recuperadas de linfonodos de drenagem da lesão pode ter sido determinante tanto para a inflamação quanto para o posterior controle da infecção.

EAEPA parece contribuir para uma resposta Th1, essencial para eliminação dos protozoários causadores da leishmaniose cutânea. Posivelmente, uma baixa concentração de IL-4, maior concentração de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$  nos animais tratados com EAEPA, permitiu uma resolução da lesão. Essa hipótese estaria de acordo com os achados da literatura de que a baixa infectividade de *L. braziliensis* em camundongos BALB/c está relacionada com a capacidade de estes animais desenvolverem uma forte resposta Th1, e a cura é acompanhada por um aumento de IFN- $\gamma$  e dependente desta citocina, pois camundongos quando tratados com anti-IFN- $\gamma$ , apresentaram aumento significativo na espessura das lesões e a infecção não se resolvia (DEKREY; LIMA; TITUS, 1998).

A cicloxigenase (COX) está envolvida na ativação de mediadores lipídicos derivados do metabolismo do ácido araquidônico. Este é convertido a prostaglandina intermediária, PGE<sub>2</sub>, pela ação da prostaglandina sintase, mais comumente conhecida como cicloxigenase (COX) (HARRIS et al, 2002). Essa enzima pode se apresentar em duas formas: COX-1, expressa constitutivamente, e COX-2, com expressão induzível em processos inflamatórios (FUNK, 2001). A COX-2 pode exercer um papel homeostático, pró-inflamatório ou anti-inflamatório (PARK et al, 2006). Mediadores lipídicos desempenham um papel crucial na infecção por *Leishmania*. Ribeiro-Gomes et al., (2004) apontou que a interação *in vitro* entre macrófagos infectados e neutrófilos apoptóticos no modelo experimental murino resultou no sucesso da infecção por *Leishmania* e aumento da carga parasitária por um mecanismo de supressão da resposta imune dependente da produção de PGE<sub>2</sub> e TGF- $\beta$ . PGE<sub>2</sub> exógeno também foi capaz de aumentar a carga parasitária em macrófagos de BALB/c infectados com *L. amazonensis* (PINHEIRO et al, 2009). Esses estudos explicitam que a COX-2 e o seu produto podem estar relacionados com a persistência da infecção, dados não encontrados no presente estudo, o qual houve aumento na produção de COX-2, mas com redução da parasitemia.

Macrófagos, além da função imune-inflamatória, produzem também fatores angiogênicos, como VEGF (fator de crescimento endotelial) capaz de induzir a formação de novos vasos (angiogênese). Esses vasos sustentam a inflamação permitindo que mais células cheguem ao local da lesão (KUMAR; ABBAS; FAUSTO 2007). VEGF e TGF- $\beta$  ativam as células endoteliais, que iniciam a expressão do ativador de plasminogênio, que cliva o plasminogênio sérico e a pró-colagenase em plasmina, com ação fibrinolítica (KIERSZENBAUM A., 2004). A expressão de VEGF após o tratamento com EAEPA foi maior que no grupo controle e no grupo tratado com Glucantime, resultado que pode ser

relacionado a um processo de cura das lesões de leishmaniose, pois esta cura inicia-se com o processo de inflamação observado histologicamente com a presença de células mononucleares e neutrófilos. É relatado que após o tratamento convencional, com as drogas de escolha, observa-se uma diminuição na inflamação, com a deposição de fibras de colágeno, que indicam a cicatrização (VIANA et al., 2013).

A resposta inflamatória na lesão decorrente da disseminação da *L. braziliensis* é uma inflamação crônica e imune em resposta à presença do parasita. Essa resposta inflamatória tecidual inicia-se com vasodilatação e ativação de células endoteliais para adesão e migração de células para o tecido infectado. Os vasos são necessários para que as células da resposta imune inflamatória migrem da circulação para o interstício tecidual. As primeiras células que chegam ao local da lesão são os neutrófilos, porém se a agressão tecidual permanecer, células mononucleares, macrófagos e linfócitos vão migrar para o local (KUMAR; ABBAS; FAUSTO 2007).

### **Avaliação da reação inflamatória**

Para avaliar a resposta inflamatória induzida por EAEPa e demais tratamentos nas orelhas, cortes histopatológicos das orelhas infectadas e sadias (controle negativo) foram analisados, observando os parâmetros: intensidade do infiltrado, necrose, polimorfonucleares, macrófagos, macrófagos vacuolizados e amastigotas.

No modelo da infecção experimental murina, na orelha, o tratamento com EAEPa i.p. mostrou resultados semelhantes ao do grupo tratado com Glucantime®. A carga parasitária reduziu em torno de 300 e 400 vezes, respectivamente, em relação ao controle sem tratamento. A qualidade da resposta inflamatória, nos três grupos foi muito semelhante, exceto pela presença de macrófagos vacuolizados no grupo sem tratamento (DMSO), frequentemente contendo amastigotas (Tabela 3). O menor número de parasitos observados nas lesões dos animais tratados com EAEPa e com Glucantime demonstrou que EAEPa também pode ser relevante para a diminuição da carga parasitária *in situ*. Esse fato foi confirmado na análise histológica das lesões dos animais desses grupos, em que foram encontrados parasitos em menor intensidade bem como ausência de necrose, sugerindo que ocorreu uma resposta mais eficiente, conduzindo mais rápido ao processo de cura.

**Tabela 3.** Análise histopatológica das orelhas de camundongos BALB/c infectados com *Leishmania braziliensis*, e tratados via intraperitoneal (IP) durante 20 dias com extrato acetato de etila de *Plectranthus amboinicus* ou Glucantime. Os eventos foram classificados de acordo com sua frequência na lesão: 0, + (1-25%), ++ (25-50%), +++ (> 50%).

	Infiltrado	Necrose	PMN	Macrófagos	Macrófagos vacuolizados	Amastigotas
<b>Não infectado</b>	-	-	-	-	-	-
<b>Controle (DMSO)</b>	++	-	+	+	+	+++
<b>Glucantime®</b>	+	-	+	+	-	-
<b>EAEPA (via IP)</b>	+	-	+	+	-	+

PMN: leucócitos polimorfonucleares.

Oliveira & Barral-Neto (2005) relatam que a infecção pela cepa de *L. braziliensis* induz a um maior recrutamento de células (neutrófilos e macrófagos) para o local da inoculação do parasita. Isso foi possível observar no presente estudo onde no grupo controle o infiltrado inflamatório consistia de células polimorfonucleares e de macrófagos parasitados. Já no grupo tratado com EAEPA, ao passo que se observa o início do processo de cicatrização, o infiltrado inflamatório consistia de escassos macrófagos parasitados.

Por fim, os principais achados deste trabalho mostraram que EAEPA surge como um potencial alvo para auxiliar na terapia de pacientes infectados com cepas de *Leishmania braziliensis*. Sendo os resultados obtidos *in vitro*, reprodutíveis em modelo *in vivo*. Podendo atuar em diferentes funções e fenômenos durante uma resposta inflamatória e na hemostasia podendo relacionar alguns efeitos adversos na sua administração. Nesse sentido, é importante ressaltar que neste trabalho o efeito benéfico de EAEPA na infecção por *L. braziliensis* foi observado com um tempo curto de tratamento, o que confirma seu potencial na terapêutica da leishmaniose cutânea. Um estudo mais detalhado, *in vivo*, deve ser realizado para elucidar melhor os mecanismos que levaram a baixa parasitemia após o tratamento, bem como, para que se possa associar algum ou alguns constituintes químicos a esse efeito.

## Aprovação ética

Todos os procedimentos em estudos envolvendo animais foram realizados de acordo com o Comitê de Ética em Uso Animal em Experimentação do Comitê de Ética Animal de Pesquisa da Universidade Federal do Ceará (protocolo número 75/2011).

## Conflito de interesses

Os autores declaram que não têm conflito de interesses.

## Referências

- ALVAR, J.; VÉLEZ, I.D.; BERN, C.; HERRERO, M.; DESJEUX, P.; CANO, J. et al. Leishmaniasis Worldwide and Global Estimates of Its Incidence. **PLoS ONE** 7(5): e35671. 2012. doi:10.1371/journal.pone.0035671
- ANDRADE, A.C.; FRANÇA, L.A.; ARAUJO, C.F.; ROCHA, V.J.; SILVA, M.C.B.; FIGUEIRAS, C.P.; OLIVEIRA, P.R.; FREITAS, L.A.R.; VERAS, P.S.T.; CARVALHO, L.P. Extracellular Vesicles from Leishmania-Infected Macrophages Confer an Anti-infection Cytokine-Production Profile to Naïve Macrophages. **PLoS neglected Tropical Diseases**, v.8, n.9, p.3161, Setembro 2014.
- ARAÚJO CAC, ALEGRIO LV, LEON LL. Antileishmanial activity of compounds extracted and characterized from *Centrobium sclerophyllum*. **Phytochemistry** 49: 751-754. 1998.
- ARUMUGAM, G.; SWAMY, M.K.; SINNIHAH, U.R. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng: Botanical, Phytochemical, Pharmacological and Nutritional Significance. **Molecules**, 21, 369. 2016
- BILLO.A, M.; FOURNETA,A.; CABALIONB, B.P.; WAIKEDREB, J.; BORIESC, C.; LOISEAUC, P.; PRINAA, E.; ROJAS DE ARIASE, A.; YALUFFE, G.; FOURNEAUA, C.; HOCQUEMILLER, R. Screening of New Caledonian and Vanuatu medicinal plants for antiprotozoal activity. **Journal of Ethnopharmacology**. Volume 96, Issue 3, 15, p. 569–575, 2005.
- BO MA, Y. et al.; Simultaneous Determination of Oridonin, Ponicidin and Rosmarinic Acid from *Herba Isodi Rubescentis* Extract by LC–MS–MS in Rat Plasma. **J Chromatogr Sci**. 51(10):910-918. 2013. doi: 10.1093/chromsci/bms189
- BOAVENTURA VS, CAFE V, COSTA J, et al. Concomitant early mucosal and cutaneous leishmaniasis in Brazil. **Am J Trop Med Hyg**. 75: 267–269. 2006
- BOGDAN, C.; DONHAUSER, N.; DORING, R.; ROLLINGHOFF, M.; DIEFENBACH, A.; RITTIG, M. G. Fibroblasts as host cells in latent leishmaniosis. **J Exp Med**, v. 191, n. 12, p. 2121-2130, 2000.



BOTTCHER, A. et al. Igor Cesarino, Adriana Brombini dos Santos, Renato Vicentini, Juliana Lischka Sampaio Mayer, Ruben Lignification in Sugarcane: Biochemical Characterization, Gene Discovery, and Expression Analysis in Two Genotypes Contrasting for Lignin Content. **Plant Physiol.** 163: 1539-1557. 2013. doi:10.1104/pp.113.225250

CARVALHO LP, PASSOS S, SCHRIEFER A & CARVALHO EM. Protective and pathologic immune responses in human tegumentary leishmaniasis. **Front Immunol.** 3: 301. 2012.

CHAN-BACAB, M. J.; PENÃ-RODRIGUEZ, L. M. Plant natural products with leishmanicidal activity. **Nat. Prod. Rep.**, v. 18, n. 6, p. 674-688, 2001.

CHILDS GE, LIGHTNER LK, MCKINNEY L, GROVES MG, PRICE EE, HENDRICKS LD. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis. I. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana*, and *L. aethiopica*. **Ann Trop Med Parasitol** 78: 25-34, 1984.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clini. Microbiol.**, v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.

DAS, P.; LAHIRI, A.; LAHIRI, A.; CHAKRAVORTTY, D. Modulation of the arginase pathway in the context of microbial pathogenesis: a metabolic enzyme moonlighting as an immune modulator. **PLoS Pathog**, v. 6, n. 6, p. e1000899, 2010.

DE MOURA, T.R. et al. Toward a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Infect. Immun.** 73(9):5827-5834. 2005.

DEKREY, G.K.; LIMA, H.C.; TITUS, R.G. Analysis of the Immune Responses of Mice to Infection with *Leishmania braziliensis*. **Infect. Immun.** 66(2):827-829. 1998.

DESJEUX, P. Leishmaniasis: current situation and new perspectives. **Comp Immunol Microbiol Infect Dis.** 27(5):305-18. 2004. <http://dx.doi.org/10.1016/j.cimid.2004.03.004>

DUQUE GA, FUKUDA M, TURCO SJ, STAGER S & DESCOTEAUX A. *Leishmania* promastigotes induce cytokine secretion in macrophages through the degradation of synaptotagmin XI. **J Immunol.** 193: 2363-2372. 2014.

EL- HAWARY, SEHAN. Poliphenolics content and biological activity of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) spreng growing in Egypt. **Phcog J.** 4(32). 2012.

ESPIR TT, FIGUEIRA LDE P, NAIFF MDE F, et al. The role of inflammatory, anti-inflammatory, and regulatory cytokines in patients infected with cutaneous leishmaniasis in Amazonas State, Brazil. **J Immunol Res.** 2014: 481750. 2014

FUNK, C. D. Prostaglandins and leukotrienes: advances in eicosanoid biology. **Science**, v. 294, n. 5548, p. 1871-1875, 2001.

GAZIM ZC, DEMARCHI IG, LONARDONI MVC, et al. Acaricidal activity of the essential oil from *Tetradenia riparia* (Lamiaceae) on the cattle tick *Rhipicephalus* (*Boophilus*) *microplus* (Acari; Ixodidae). **Exp Parasitol.** 129: 175-178. 2011.

GIUDICE, A.; CAMADA, I.; LEOPOLDO, P.T.G.; PEREIRA, J.M.B.; RILEY, L.W.; WILSON, M.E.; HO, J.L.; DE JESUS, A.R.; CARVALHO, E.M.; ALMEIDA, R.P. Resistance of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*

to nitric oxide correlates with disease severity in Tegumentary Leishmaniasis.

**BioMedCentral Infectious Diseases**, v.7, n.7, 2007. doi:10.1186/1471-2334-7-7

GOMES, I.N. et al. Differential properties of CBA/J mononuclear phagocytes recovered from an inflammatory site and probed with two different species of *Leishmania*. **Microbes and Infection**. 5(4): 251–260. 2003.

GOMES-SILVA, A.; SOUZA, M.A.; AFONSO-CARDOSO, S.R.; ANDRADE, L.R.; DIETZE, R.; LEMOS, E.; BELLI, A.; FAVORETO, JÚNIOR, S.; FERREIRA, M.S. Serological reactivity of different antigenic preparations of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and the *Leishmania braziliensis* complex. **Rev Soc Bras Med Trop** 41: p. 135–141. 2008.

HARBAUM, B. et al. Identification of flavonoids and hydroxycinnamic acids in pak choi Varieties (*Brassica campestris* L. ssp. *Chinensis* var. *communis*) by HPLC-ESI-MS and NMR and their quantification by HPLC-DAD. **J. Agric. Food Chem.** 55(20). 2007

HARLEY, R. M; REYNOLDS, T. **Advances in Labiatae Science**. Great Britain: Royal Botanic Gardens Kew, 1992.

HARRIS SG, PADILLA J, KOUMAS L, RAY D, PHIPPS RP. Prostaglandins as modulators of immunity. **Trends Immunol**, v. 23, n. 3, p. 144-150, 2002.

HOSSAIN, M.; DILIP, K.; BRUNTON, N.; MARTIN-DIANA, A.; BARRY-RYAN, C. Characterization of Phenolic Composition in Lamiaceae Spices by LC-ESI-MS/MS. **J. Agric. Food Chem.** 58 (19):10576–10581. 2010. doi:10.1021/jf102042g

KAM TS, SIM KM, KOYANA T, TOYOSHIMA M, HAYASH M, KOMIYAMA K. Citotoxic and Leishmanicidal aminoglycoesteroids and aminosteroids from *Holarrhena curtisii* **J Nat Prod** 61: 1332-1336. 1997.

KIERSZENBAUM, A. L. **Histologia e biologia celular: uma introdução à patologia**. Rio de Janeiro: Elsevier. p.168-70. 2004.

KOUTSONI, O; BARHOUMI, M; GUIZANI, I; DOTSIKA, E. Leishmania eukaryotic initiation factor (LeIF) inhibits parasite growth in murine macrophages. **PLoS One**, v.9, n.5, May 2014.

KUMAR, V.; ABBAS, A.; FAUSTO, N. **Robbins e Cotran Patologia- Bases Patológicas das doenças**. 7ed. Rio de Janeiro. Elsevier. 2007.

KUNFENG, D. et al. LC–MS/MS determination and pharmacokinetic study of five flavone components after solvent extraction/acid hydrolysis in rat plasma after oral administration of *Verbena officinalis* L. extract, *Journal of Ethnopharmacology*, 135(2):201-208. 2011. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2011.01.002>.

LIEW, F.Y.; PARKINSON, C.; MILLOTT, S.; SEVERN, A.; CARRIER, M. Tumour necrosis factor (TNF alpha) in leishmaniasis. I. TNF alpha mediates host protection against cutaneous leishmaniasis. **Immunol.** 69:570-573; 1990.

LIMA, S.C.G. et al. In Vitro and In Vivo Leishmanicidal Activity of *Astronium fraxinifolium* (Schott) and *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng against *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **BioMed Research International**, 2013.

- LIU, D; UZONNA, J.E. The early interaction of Leishmania with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Frontiers in Cellular Microbiology and Infection** ;v. 2,n. 83, 2012doi: 10,3389 / fcimb.2012.00083.
- LUKHOBBA, C. W.; SIMMONDS, M. S. J.; PATON, A. J. Plectranthus: A review of ethnobotanical uses. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 11, p. 1-24, 2006.
- MAJUMDER, S. et al. Leishmania-Induced Biphasic Ceramide Generation in Macrophages Is Crucial for Uptake and Survival of the Parasite. **J Infect Dis**; 205 (10): 1607-1616. doi: 10.1093/infdis/jis229. 2012.
- MATOS, F. J. A. ; *et al.* Essential oil of Mentha x villosa Huds. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, p. 41-44, 1999.
- MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil.** Fortaleza: Imprensa Universitária, 2000.
- MATOS, F. J.A. **Introdução à fitoquímica experimental.** UFC Edições. p. 44-46, 1997.
- MEHEUS, F.; BALASEGARAM, M.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; RIJAL, S.; FAIZ, M.D.; BOELAERT, M. Cost-effectiveness analysis of combination therapies for visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. **PLoS**. 2010.
- MOLL, H.; FLOHE, S.; BLANK, C. Dendritic cells seclude Leishmania parasites that persist in cured mice – a role in the maintenance of T-cell memory? **Adv. Exp.Med. Biol.** 378:507–509; 1995.
- OKEM A, FINNIE JF & VAN STADEN J. Pharmacological, genotoxic and phytochemical properties of selected South African medicinal plants used in treating stomach-related ailments. **J Ethnopharmacol.** 139: 712–720. 2012.
- OLIVEIRA, C.I.; BARRAL-NETTO, M. O Modelo Experimental nas Infecções Causadas por *L. amazonensis* e *L. braziliensis*. *Gaz. méd. Bahia.*75:1(Jan-Jun):35-45. 2005.
- OLIVEIRA,W.N.; RIBEIRO, L.E.; SCHRIEFFER, A; CARVALHO, E.M.; OLÍVIA BACELLAR,O. The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. **Cytokine**, v.66, n.2, p.127-132. April 2014.
- OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Leishmaniasis. 2015. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> Acesso em: 15 de outubro de 2015.
- PARK, G. Y.; CHRISTMAN, J. W. Involvement of cyclooxygenase-2 and prostaglandins in the molecular pathogenesis of inflammatory lung diseases. **Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol**, v. 290, n. 5, p. L797-805, 2006.
- PINHEIRO, R. O.; NUNES, M. P.; PINHEIRO, C. S.; D'AVILA, H.; BOZZA, P. T.; TAKIYA, C. M.; CORTERREAL, S.; FREIRE-DE-LIMA, C. G.; DOSREIS, G. A. Induction of autophagy correlates with increased parasite load of Leishmania amazonensis in BALB/c but not C57BL/6 macrophages. **Microbes Infect**, v. 11, n. 2, p. 181-190, 2009.
- RIBEIRO-GOMES, F. L.; OTERO, A. C.; GOMES, N. A.; MONIZ-DE-SOUZA, M. C.; CYSNEFINKELSTEIN, L.; ARNHOLDT, A. C.; CALICH, V. L.; COUTINHO, S. G.; LOPES, M. F.; DOSREIS, G. A. Macrophage interactions with neutrophils regulate Leishmania major infection. **J Immunol**, v. 172, n. 7, p. 4454-4462, 2004.

ROCHA, F.J.S., SCHLEICHER, U., MATTNER, J., ALBER, G., BOGDAN, C. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. **Infect. Immun.** 75:3823-3832; 2007.

SEIFERT, K. & CROFT, S. L. *In vitro* and *in vivo* interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, p. 73-79, 2004.

SOTO, J. et al. Miltefosine for New World cutaneous leishmaniasis. **Clinical infections disease**, v. 38, p. 266-1267, 2004.

SUNDAR, S. & CHAKRAVARTY, J. Antimony Toxicity. **Int J Environ Res Public Health**.7:4267-77, 2010.

TEIXEIRA, M. J. **Avaliação do efeito leishmanicida *in vitro* e *in vivo* de constituintes químicos ativos derivados de plantas medicinais**. Fortaleza. Universidade Federal do Ceará. p. 73,1999.

Teixeira, M. J., de Almeida, Y. M., Viana, J. R., Holanda Filha, J. G., Rodrigues, T. P., Prata, J. R. C., Coêlho, I. C. B., Rao, V. S. and Pompeu, M. M. L. (2001), IN VITRO and IN VIVO Leishmanicidal activity of 2-hydroxy-3-(3-methyl-2-butenyl)-1,4-naphthoquinone (lapachol). **Phytother. Res.**, 15:44–48.

TEMPONE, A.G. et al. Brazilian flora extracts as source of novel antileishmanial and antifungal compounds. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103(5): p. 443-449, 2008.

VIANA, S.M. Persistência da infecção por *leishmania braziliensis* em camundongos balb/c mediada por citocinas e quimiocinas. Universidade Federal do Ceará. 2013.

WANASEN, N. & SOONG, L. L-arginine metabolism and its impact on host immunity against *Leishmania* infection. **Immunol Res**, v. 41, n. 1, p. 15-25, 2008.

YUAN-SIAO, C. et al. “Chemical constituents of *Plectranthus amboinicus* and the synthetic analogs possessing anti-inflammatory activity,” **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 2014.

**CAPÍTULO VI****CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS**

---

## CONCLUSÕES

---

O presente estudo buscou traçar o perfil de ação *in vitro* e *in vivo* do extrato acetato de etila de *Plectranthus amboinicus* em modelo de infecção por *Leishmania braziliensis*. Obtendo-se nos ensaios *in vivo* a confirmação dos resultados obtidos *in vitro*. Os ensaios *in vivo* foram conduzidos através de dois modelos de infecção para Leishmaniose cutânea, em pata em Hamsters e em orelha em camundongos. Através do primeiro modelo, pôde-se estabelecer um protocolo de tratamento mais prolongado, testar duas vias de administração diferentes obtendo-se uma melhor resposta ao tratamento com EAEPA. Já no segundo modelo de infecção, na orelha de camundongos BALB/c, que se acredita ser mais representativo da infecção natural em seres humanos como, a auto cura, a presença de lesão ulcerada, disseminação do parasito para os linfonodos e desenvolvimento de uma resposta imunológica mista Th1/Th2; a resposta ao tratamento foi mais discreta, tendo ocorrido a cura espontânea das lesões em todos os grupos avaliados, mas com redução da quantidade de parasitos no linfonodo de drenagem no grupo tratado com EAEPA similar ao grupo tratado com Glucantime.

Em resumo, as principais respostas obtidas a partir desse estudo consistem em:

- O estudo fitoquímico dos extratos hexano, diclorometano, acetato de etila e etanol das folhas de *P. amboinicus* revelou a presença de flavonoides, glicosídeos digitalicos e esteróides nos extratos de hexano e diclorometano; flavonóides, glicosídeos digitálicos, taninos e esteróides no extrato de acetato de etila; e flavonoides, glicosídeos digitalicos, antraquinonas e alcalóides no extrato de etanol;
- A análise química por UPLC–QTOF–MS do extrato acetato de etila das folhas de *Plectranthus amboinicus* identificou a presença de algumas moléculas conhecidas, nomeadamente: ácido quinico, ácido protocatecuico, ácido caféico, coumaroilmalato, timoquinona, ácido siríngico, ácido rosmarínico, luteolina, apigenina, tricine, cirsimaritin;
- O screening *in vitro* da ação dos extratos de *P. amboinicus* sobre as formas promastigotas mostrou que o extrato acetato de etila de *P. amboinicus* (EAEPA) foi eficaz em inibir o crescimento de promastigotas *L. (V.) braziliensis*, reduzindo em quase cem por cento a quantidade de promastigotas na concentração 4mg/mL;
- A citotoxicidade de EAEPA em macrófagos intraperitoneais murinos estabeleceu as concentrações não citotóxicas para serem testadas nos demais ensaios *in vitro*. Os

resultados mostraram que EAEPA apresentou efeito tóxico a partir de 0,125mg/mL, elegendo-se utilizar nos tratamentos *in vitro* as concentrações 0,06 e 0,03mg/mL;

- EAEPA mostrou-se capaz de atuar sobre macrófagos infectados com as formas amastigotas de *L. (V.) braziliensis* após 24h de tratamento com EAEPA nas duas concentrações não citotóxicas testadas, 0,03 e 0,06mg/mL, resultando em uma redução de 60 e 67,24% respectivamente da carga parasitária;
- A determinação da concentração de citocinas pró e anti-inflamatórias mostrou que o tratamento *in vitro* com EAEPA resultou em uma baixa produção de IL-4, alta produção de IL-10 e TNF- $\alpha$  e discreta produção de TGF- $\beta$ . Podendo-se sugerir uma ação moduladora, por regular a secreção de citocinas pró e anti-inflamatórias que estão relacionadas com a exacerbação e ou controle da doença;
- A toxicidade foi avaliada utilizando-se camundongos Swiss e de acordo com o esquema proposto, a DL50 foi estimada como sendo de > 5000 mg/kg;
- Através do modelo de infecção por *L. (V.) braziliensis* em pata de Hamster foi possível a realização de um tratamento prolongado com EAEPA testando duas vias de administração e observando-se redução significativa do tamanho da lesão e carga parasitária após o tratamento por via intraperitoneal comprovados através de análise histopatológica das lesões e obtenção de baixo número de parasitas em macrófagos e necrose discreta;
- O tratamento da infecção por *L. (V.) braziliensis* em camundongos BALB/c foi realizado durante 15 dias e apesar de se ter utilizado uma concentração de EAEPA expressiva, (250mg/kg/dia) e uma boa via de administração (previamente testada) os resultados obtidos foram discretos. Houve cura espontânea das lesões após trinta dias de infecção (15 dias de tratamento) em todos os grupos avaliados, mas houve diminuição na quantidade de parasitos no linfonodo de drenagem no grupo tratado com EAEPA e Glucantime. EAEPA pode ter atuado de forma direta contra o parasita intracelular e/ou por meio da modulação da resposta imune levando a ativação de macrófagos, em que estes produziram outras substâncias que não NO proporcionando uma redução da carga parasitária dentro do macrófago, sem causar danos à célula. Apesar dos parasitos terem acionado os mecanismos de escape diminuindo o stress oxidativo intracelular, mesmo assim houve morte parasitária, evidenciando um descontrole dos mecanismos protetores parasitários certamente desencadeados por EAEPA.

## PERSPECTIVAS FUTURAS

---

A ação leishmanicida de *Plectranthus amboinicus* elucidada nesse trabalho através do tratamento em dois modelos animais de infecção por *Leishmania braziliensis* que pode ser atribuída a algum (ou alguns) dos diferentes compostos identificados no extrato acetato desta planta, abre possibilidades ao desenvolvimento de um novo fitoterápico capaz de diminuir a parasitemia ou até mesmo a cura da infecção por *Leishmania braziliensis*, com baixa toxicidade e poucos efeitos adversos.

Um estudo bio guiado a fim de identificar o(s) composto(s) contido(s) no extrato acetato de etila de *Plectranthus amboinicus*, que possuir melhor ação leishmanicida e qual o mecanismo dessa ação pode ser conduzido para melhor elaboração desse fitoterápico leishmanicida.

A avaliação de concentrações mais elevadas de *Plectranthus amboinicus*, de um tratamento com tempo mais prolongado, outra via de administração e a associação com outros extratos de plantas, por exemplo, *Astronium fraxinifolium*, pode demonstrar uma ação terapêutica contra *L. braziliensis* ainda melhor para *P. amboinicus*.



**REFERÊNCIAS**

---

## REFERÊNCIAS

---

- ABBAS, ABUL K.; LICHTMAN, ANDREW H; PILL, SHIV. **Imunologia Celular e Molecular**. 7a. edição, Elsevier, 2015.
- ABDEL-MOGIB, M., ALBAR, H. A., & BATTERJEE, S. M. Chemistry of the genus *Plectranthus*. **Molecules**, v. 7, p. 271–301, 2001.
- ADL, S.M.; SIMPSON, A.G.; FARMER, M.A.; ANDERSEN, R.A.; ANDERSON, O.R.; BARTA, J.R.; BOWSER, S.S.; BRUGEROLLE, G.; FENSOME, R.A.; FREDERICQ, S. The new higher level classification of eukaryotes with emphasis on the taxonomy of protists. **J. Euk. Microb.** v. 52, p. 399-451, 2005.
- AFONSO, L. C. C.; SCOTT, P. Immune Responses Associated with Susceptibility of C57BL/10 Mice to *Leishmania amazonensis*. **Infect. and Immun.**, v. 61, n. 7, p. 2952-2959, 1993.
- AGUILAR-TORRENTERA, F.; CARLIER, Y. Immunological factors governing resistance and susceptibility of mice to *Leishmania major* infection. **Revista Latino. Am. de Microbi.**, v. 43, n. 3, p. 135-142, 2001.
- ALEXANDER, J.; BROMBACHER, F. T helper1/t helper2 cells and resistance/susceptibility to *Leishmania* infection: is this paradigm still relevant? **Front. Immunol.** 3:80, 2012.
- ALEXANDER, J.; BROMBACHER, F.; MCGACHY, H. A.; MCKENZIE, A. N.; WALKER, W.; CARTER, K. C. An essential role for IL-13 in maintaining a non-healing response following *Leishmania mexicana* infection. **European Journal of Immunology**, v. 32, p. 2923–2933, 2002.
- ALEXANDER, J.; BRYSON, K. T helper (h)1/Th2 and *Leishmania*: paradox rather than paradigm. **Immun. Lett.**, v. 99, p. 17-23, 2005.
- ALEXANDER, J.; CARTER, K. C.; AL-FASI, N.; SATOSKAR, A.; BROMBACHER, F. Endogenous IL-4 is necessary for effective drug therapy against visceral leishmaniasis. **European Journal of Immunology**. v.30, p.2935–2943, 2000.
- ALMEIDA, M. C.; BARRAL, A.; BARRAL-NETO, M. Leishmanial infection: analysis of its first steps. A review. **Memó. do Instit. Oswa. Cruz**, v. 8, n. 7, p. 861-870, 2003.
- Americas: Washington: Pan American Health Organization; 2016.
- AMPUERO, J.; MACÊDO V.; MARSDEN P. Características clínicas da leishmaniose tegumentar em crianças de 0 a 5 anos em uma área endêmica de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis*. **Rev Soc Bras Med Trop**. v. 39. p. 22-26, 2006.
- APROTOSOAIE, A.C., RAILEANU, E., ADRIANA, T., & CIONCĂ, O. The polyphenolic content of common Lamiaceae species available as herbal tea products in Romanian pharmacies. **Rev. Med. Chir. Soc. Med. Nat**, v. 117, p. 233–237, 2013.
- AREVALO, J.; RAMIREZ, L.; ADAUI, V.; ZIMIC, M.; TULLIANO, G.; MIRANDA-VERASTEGUI, C.; LAZO, M.; LOAYZA-MURO, R.; DE DONCKER, S.; MAURER, A.; CHAPPUIS, F.; DUJARDIN, JC.; LLANOS-CUENTAS, A. Influence of *Leishmania*

(*Viannia*) species on the response to antimonial treatment in patients with American tegumentary leishmaniasis. **The Jour. of Infect. Disea.**, v. 195, p. 1846-1851. 2007.

ASIF, M., & KHODADADI, E. Medicinal uses and chemistry of flavonoid contents of some common edible tropical plants. **Journal of Paramedical Sciences**, v. 4, 2013.

ASSIS, D. M. et al. Inhibition of cysteine proteases by a natural biflavone: behavioral evaluation of fukugetin as papain and cruzain inhibitor. **J. Enzyme Inhib. Med. Chem.**, on line, p. 1-10, 2012.

AWASTHI, A.; MATHUR, R.K.; SAHA, B. Immune response to *Leishmania* infection. **Indian Journal of Medical Research**, v.119, p. 238-258, 2004.

BALDWIN, T. M.; ELSO, C.; CURTIS, J.; BUCKINGHAM, L.; HANDMAN, E. The Site of *Leishmania major* Infection Determines Disease Severity and Immune Responses. **Infect. and Immun.**, v. 71, n. 12, p. 6830-6834, 2003.

BARATA, L. E. S. et al. Anti-leishmanial activity of neolignans from *Virola* species and synthetic analogues. **Phytochemistry**, v. 55, p. 589–595, 2000.

BIEDERMANN, T.; ZIMMERMANN, S.; HIMMELRICH, H.; GUMY, A.; EGETER, O.; SAKRAUSKI, A. K.; SEEGMÜLLER, I.; VOIGT, H.; LAUNOIS, P.; LEVINE, A. D.; WAGNER, H.; HEEG, K.; LOUIS, J. A.; RÖCKEN, M. IL-4 instructs TH1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice. **Nature Immunology**, v. 2, n. 11, p.1054-60. 2001.

BILLO.A, M.; FOURNETA,A.; CABALIONB, B.P.; WAIKEDREB, J.; BORIESC, C.; LOISEAUC, P.; PRINAA, E.; ROJAS DE ARIASE, A.; YALUFFE, G.; FOURNEAUA, C.; HOCQUEMILLER, R. Screening of New Caledonian and Vanuatu medicinal plants for antiprotozoal activity. **Journal of Ethnopharmacology**. Volume 96, Issue 3, 15, p. 569–575, 2005.

BLUM, J.; DESJEUX, P.; SCHWARTZ, E.; BECK, B.; BECK, B.; HATZ, C. Treatment of cutaneous leishmaniasis among travellers. **Jour. of Antimicrob. Chemothe.**, v. 53, n. 2, p. 158-166, 2004.

BOGDAN, C., et al. Invasion, control and persistence of *Leishmania* parasites. **Current Opinion in Immunology**, London, v. 8, p. 517-525, Aug. 1996.

BOGDAN, C.; DENKERS, E. Y.; GAZINELLI, R. T. Phagocyte effector functions against *Leishmania* parasites. In: Protozoans in macrophages. **Landes Biosci.**, p. 193-206, 2007.

BOMFIM, G.; ANDRADE, B. B.; SANTOS, S.; CLARENCIO, J.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A. Cellular analysis of cutaneous leishmaniasis lymphadenopathy: insights into the early phases of human disease. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 77, p. 854–859.2007.

BORGES, M. M. A.; CAMPOS-NETO, P.; SLEATH, K. H.; GRABSTEIN, P. J.; MORRISSEY, P. J.; SKEIKY, Y. A. W.; REED, S. G. Potent stimulation of the innate immune system by a *Leishmania brasiliensis* recombinant protein. **Infec. and Immune.**, v. 69, n. 9, p. 5270-5277, 2001.

BOURREAU, E.; PREVOT, G.; GARDON, J.; PRADINAUD, R.; LAUNOIS, P. High intralésional interleukin-10 messenger RNA expression in localized cutaneous leishmaniasis

is associated with unresponsiveness to treatment. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 184, p. 1628–1630. 2001a.

BOURREAU, E.; PREVOT, G.; PRADINAUD, R.; LAUNOIS, P. Interleukin (IL)-13 is the predominant Th2 cytokine in localized cutaneous leishmaniasis lesions and renders specific CD41T cells unresponsive to IL-12. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 183, p. 953–959. 2001b.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Práticas integrativas e complementares: plantas medicinais e fitoterapia na Atenção Básica/Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Departamento de Atenção Básica. Brasília: Ministério da Saúde, 2012.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Atlas de leishmaniose tegumentar americana: diagnósticos clínico e diferencial. p.136, 2006.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das doenças transmissíveis. Manual de Recomendações para diagnóstico, tratamento e acompanhamento de pacientes com a co-infecção Leishmania-HIV, 2015.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Leishmaniose Visceral: Recomendações Clínicas para a redução da letalidade. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 1ed. Brasília: Editora do Ministério da Saúde, 2011.

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica. 1. ed., 5. reimpr. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

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

BRASIL. **Ministério da Saúde**. Situação epidemiológica da Leishmaniose Tegumentar-Casos. 2014. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br>. Acesso em 07 de outubro de 2015.

CARVALHO, E. M. **Immunology in Brazil**. Ciência e Cultura. .5 ed. 1994.

CASTILHO, T. M.; GOLDSMITH-PESTANA, K.; LOZANO, C.; VALDERRAMA, L.; SARAIVA, N. G.; MCMAHON-PRATT, D. Murine model of chronic *L. (Viannia) panamensis* infection: role of IL-13 in disease. **European Journal of Immunology**, v. 40, p. 2816-29, 2010.

CASTILLO, R.A.M; GONZALEZ, V.P. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng. **Rev. Cubana Plant. Med.** 3: 110-5. 1999.

CECÍLIO, P.; PÉREZ-CABEZAS, B.; SANTARÉM, N.; RODRIGUES, V.; DA SILVA, A. C. Deception and manipulation: the arms of *Leishmania*, a successful parasite. **Front. in Immun.**, v. 5, n. 480, p. 1-16, 2014.

CECÍLIO, P.; PÉREZ-CABEZAS, B.; SANTARÉM, N.; RODRIGUES, V.; DA SILVA, A. C. Deception and manipulation: the arms of *Leishmania*, a successful parasite. **Front. in Immun.**, v. 5, n. 480, p. 1-16, 2014.

CHAN-BACAB, M. J.; PENÃ-RODRIGUEZ, L. M. Plant natural products with leishmanicidal activity. **Nat. Prod. Rep.**, v. 18, n. 6, p. 674-688, 2001.

CHILDS, G. E.; LIGHTNER, L.; MCKINNEY, M. G.; GROVES, E. E.; PROICE, L. D.; HENDRICK, I. Inbred mice as model hosts for cutaneous leishmaniasis. Resistance and susceptibility to infection with *Leishmania braziliensis*, *L. mexicana* and *L. aethiopica*. **Annals of Trop. Medi. and Parasito.**, v. 78, p. 25-34, 1984.

CONCEIÇÃO-SILVA, F.; ALVES, C. R. **Leishmanioses do continente americano / Leishmaniasis in the Americas**. Rio de Janeiro; Editora Fiocruz; 2014.

COOK, F. E. M. **Economic Botany Data Collection Standard. International Working Group on Taxonomic Databases for Plant Sciences (TDWG)**. UK: Royal Botanic Gardens Kew. p. 146, 1995.

COSTA, D. L.; CARREGARO, V.; LIMA-JÚNIOR, D. S.; SILVA, N. M.; MILANEZI, C. M.; CARDOSO, C. R.; GIUDICE, A.; DE JESUS, A. R.; CARVALHO, E. M.; ALMEIDA, R. P.; SILVA, J. S. BALB/c mice infected with antimony treatment refractory isolate of *Leishmania braziliensis* present severe lesions due to IL-4 production. **PLoS Negl. Trop. Dis.**, v. 5, n. 3, p. 965, 2011.

CROFT, S. L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A. H. Drug resistance in leishmaniasis. **Clini. Microbiol.**, v. 19, n. 1, p. 111-126, 2006.

DA SILVA SANTOS, C.; BRODSKYN, C. I. The role of CD4+ and CD8+ T cells in human cutaneous leishmaniasis. **Front. in Public Heal.**, v. 2, n. 165, p. 1-6, 2014.

DA SILVA, S. A. G.; COSTA, S. S.; ROSSI-BERGMANN, B. The anti-leishmanial effect of *Kalanchoe* is mediated by nitric oxide intermediates. **Parasitology**, v. 118, p. 575-582, 1999.

DA-SILVA, S.A.G., COSTA, S.S. and ROSSI-BERGMANN, B. (1999) 'The anti-leishmanial effect of *Kalanchoe* is mediated by nitric oxide intermediates', **Parasitology**, v. 118, p. 575-582.

DE MOURA, T. R.; NOVAIS, F. O.; OLIVEIRA, F.; CLARENCIO, J.; NORONHA, A.; BARRAL, A.; BRODSKYN, C.; DE OLIVEIRA, C. I. Towards a novel experimental model of infection to study American cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania braziliensis*. **Infect. and Immun.**, v. 73, n. 9, p. 5827-5834, 2005.

DE SÁ OLIVEIRA, T.; CAPP NETO, M.; MARTINS, B.J.; RODRIGUES, H.A.; ANTONINO, R.M.; MAGALHÃES, A.V. Action of pentoxifylline on experimental cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, v. 95, n. 4, p. 477-482, Jul-Ago. 2000.

DEA-AYUELA, M.A.; RAMA-IÑIGUEZ, S.; ALUNDA, J.M.; BOLÁS-FERNANDES, F. Setting new immunological parameters in the hamster model of visceral leishmaniasis for *in vivo* testing of antileishmanial compounds. **Vet Res Comm**, v. 31, p. 703-717, 2007.

DEKREY, G. K.; LIMA, H. C.; TITUS, R. G. Analysis of the immune responses of mice to infection with *Leishmania braziliensis*. **Infect. and Immun.**, v. 66, n. 2, p. 827-829, 1998.

- DELORENZI, J. C. et al. Antileishmanial activity of an indole alkaloid from *Peschiera australis*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 45, p. 1349–1354, 2001.
- DEVAPPA, R.K., MAKKAR, H.P.S., & BECKER, K. Jatropha Diterpenes: a Review. **J Am Oil Chem Soc**, 88, 301–322. 2011.
- DUTTA, A.; SARKAR, D.; GURIB-FAKIM, A.; MANDAL, C.; CHATTERJEE, M. *In vitro* and *in vivo* activity of *Aloe vera* leaf exudates in experimental visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 102, p. 1235-1242, 2008.
- ESPITIA, C.M.; ZHAO, W.; SALDARRIAGA, O.; OSORIO, Y.; HARRISON, L.M.; CAPPELLO, M.; TRAVI, B.L.; MELBY, P.C. Duplex real-time reverse transcriptase PCR to determine cytokine mRNA expression in a hamster model of New World cutaneous leishmaniasis. **BMC Immunol**, v. 22, p. 11-31, 2010.
- FALCÃO, C. S.; DE MOURA, T. R.; CLARÊNCIO, J.; BRODSKY, C.; BARRAL, A.; DE OLIVEIRA, C. I. The presence of Tregs does not preclude immunity to reinfection with *Leishmania braziliensis*. **Int. J. Parasitol.** v. 42, n. 8, p. 771-780, 2012.
- FIGUEIREDO, N.L., FALÉ, P.L., MADEIRA, P.J.A., FLORÊNCIO, M.H., ASCENSÃO, L., SERRALHEIRO, M.L.M., & LINO, A.R.L. Phytochemical Analysis of *Plectranthus* sp. Extracts and Application in Inhibition of Dental Bacteria, *Streptococcus sobrinus* and *Streptococcus mutans*. **European Journal of Medicinal Plants**, 4(7), 794–809. 2014.
- FOURNET, A.; FERREIRA, M. E.; ROJAS DE ARIAS, A.; FUENTES, S.; TORRES, S.; INCHAUST, A.; YALUFF, G.; NAKAYAMA, H.; MAHIOU, V.; HOCQUEMILLER, R.; CAVE, A. *In vitro* and *in vivo* leishmanicidal studies of *Peperomia galioides* (Piperaceae). **Phytomedicine**, v. 3, p. 271-275, 1996.
- GARG, R. & DUBE, E.A. Animal models for vaccine studies for visceral leishmaniasis. **Indian J. Med. Res.**, v. 123, p. 439-454, 2006.
- GASPAR-MARQUES, C. Estudos fitoquímicos e Atividades biológicas de metabolitos de *Plectranthus grandidentatus* Gürke, *P. strigosus* Benth. e *P. fruticosus* L'Hérit. Tese apresentada ao departamento de Química Farmacêutica e Fitoquímica da Faculdade de Farmácia (**Universidade de Lisboa**) para obtenção do grau de doutor, orientada por Maria de Fátima Simões, Lisboa, 2006.
- GOMES, A., JERÓNIMO, A., REIS, C., & RIJO, P. New treatment strategies with plant extracts teas for Alzheimer's disease. **Biomed Biopharm Res.**, (9) 2:242. 2012.
- GOMES-SILVA, A., VALVERDE, J.G., RIBEIRO-ROMÃO, R.P., PLÁCIDO-PEREIRA, R.M. and DA-CRUZ, A.M. (2013) 'Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* infection', **Parasitology**, 140(6), pp. 771–779. doi: 10.1017/S0031182012002156.
- GONÇALVES, T.B. et al. Effect of subinhibitory and inhibitory concentrations of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on *Klebsiella pneumoniae*. **Phytomedicine**. v.19, p. 962-968. 2012.
- GONTIJO, B. & CARVALHO, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana - American cutaneous leishmaniasis. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** v. 36, 2003.

- GONZALEZ, U. et al. Interventions for American cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Cochrane Database Systematic Reviews**, 2, 2009.
- GUPTA, S. & NISHI. Visceral leishmaniasis: Experimental models for drug discovery. *Indian J Med Res* 133: 27-39. Hepburn NC 2000. Cutaneous leishmaniasis. **Clin Dermatol.** v. 25, p. 363-370, 2011.
- HANSON, R.H. Diterpenoids. **Nat. Prod. Rep.**, 22, 594-602. 2005.
- HARLEY, R. M; REYNOLDS, T. **Advances in Labiatae Science.** Great Britain: Royal Botanic Gardens Kew, 1992
- KAISER, J. Evidence mounts that tiny particles can kill, **Science**, v.289, p.22-23, July. 2000.
- KANE, M. M.; MOSSER, D. M. The role of IL-10 in promoting disease progression in leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v.166, p.1141–1147. 2001.
- KÉBAIER, C.; LOUZIR, H.; SALAH, A. B.; DELLAGI, A. K. Heterogeneity of Wild *Leishmania major* Isolates in Experimental Murine Pathogenicity and Specific Immune Response. **Infec. and Immun.**, v. 69, n. 8, p. 4906-4915, 2001.
- KEDZIERSKI, L. Leishmaniasis Vaccine: Where are We Today? **J Glob Infect Dis.** May, v.2, p.177-85. 2010.
- KLEIN, T.; LONGHINI, R.; BRUSCHI, M.L.; MELLO, J.C.P. Fitoterápicos: um mercado promissor. **Revista de Ciências Farmacêuticas Básica e Aplicada**, v.30, p. 241-248, 2009.
- KORN, T.; BETTELLI, E.; OUKKA, M.; KUCHROO, V.K. IL-17 and Th17 Cells. **Annu. Rev. Immunol.** v. 27, p.485–517, 2009.
- LAISON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. *In: W. Peters and R. Killick-Kendrick, eds.*; “The Leishmaniasis in Biology and Medicine”, London, **Acad. Press.** v.1, p.1-119, 1987.
- LAOUAR, Y.; SUTTERWALA, F. S.; GORELIK, L.; FLAVELL, R. A. Transforming growth factor-beta controls T helper type 1 cell development through regulation of natural killer cell interferon-gamma. **Nature Immunology**, v.6, n. 6, p. 600-7. 2005.
- LESSA, H.A.; MACHADO, P.; LIMA, F.; CRUZ, A.A.; BACELLAR, O.; GUERREIRO, J.; CARVALHO, E.M. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. **Am J Trop Med Hyg**, v. 65, n. 2, p. 87-89, Ago. 2001.
- LIMA, H. C.; DEKREY, G. K.; TITUS, R. G. Resolution of an infection with *Leishmania braziliensis* confers complete protection to a subsequent challenge with *Leishmania major* in BALB/c mice. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 94, n. 1, p. 71-76, 1999.
- LIMA, S.C.G. et al. In Vitro and In Vivo Leishmanicidal Activity of *Astronium fraxinifolium* (Schott) and *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng against *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **BioMed Research International**, 2013.
- LLANOS-CUENTAS, A. *et al.* Clinical and Parasite Species Risk Factors for Pentavalent Antimonial Treatment Failure in Cutaneous Leishmaniasis in Peru. **Clin. Infect. Dis.**, v. 46, n. 2, p. 223-231, 2008.

- LORENZI, H.; MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais no Brasil: nativas e exóticas**. Instituto Plantarum, Nova Odessa, 2002.
- LORÍA-CERVERA, E.N. & ANDRADE-NARVÁEZ, F.J.. Animal models for the study of leishmaniasis immunology. **Rev. Inst. Med. Trop.** Sao Paulo 56(1):1-11, January-February, 2014.
- LUKHOBBA, C. W.; SIMMONDS, M. S. J.; PATON, A. J. *Plectranthus*: A review of ethnobotanical uses. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 11, p. 1-24, 2006.
- LUNA, T.; SANTOS, S.B.; NASCIMENTO, M.; PORTO, M.A.; MUNIZ, A.L.; CARVALHO, E.M.; JESUS, A.R. Effect of TNF- $\alpha$  production inhibitors on the production of pro-inflammatory cytokines by peripheral blood mononuclear cells from HTLV-1-infected individuals. **Braz J Med Biol Res**, v. 44, n. 11, p. 1134-1140, Nov. 2011.
- MACHADO, P.R.; LESSA, H.; LESSA, M.; GUIMARÃES, L.H.; BANG, H.; HO, J.L.; CARVALHO, E.M. Oral pentoxifylline combined with pentavalent antimony: a randomized trial for mucosal leishmaniasis. **Clin Infect Dis**, v. 44, n. 6, p. 788-793, Feb. 2007.
- MAILLARD, I.; LAUNOIS, P.; HIMMELRICH, H.; ACHA-ORBEA, H.; DIGGELMANN, H.; LOCKSLEY, R. M.; LOUIS, J. A. Functional plasticity of the LACK-reactive V  $\beta$  4-V  $\gamma$  8 CD4<sup>+</sup> T cells normally producing the early IL-4 instructing Th2 cell development and susceptibility to *Leishmania major* in BALB/c mice. **European Journ. Immun.**, v. 31, p. 1288-1296, 2001.
- MARTENS, S., & MITHÖFER, A. Flavones and flavone synthases. **Phytochemistry**, 66(20), 2399–2407. doi:10.1016/j.phytochem.2005.07.013. 2005.
- MATOS, F. J. A. ; *et al.* Essential oil of *Mentha x villosa* Huds. **Journal of Essential Oil Research**, v. 11, p. 41-44, 1999
- MATOS, F. J. A. **Plantas medicinais: guia de seleção e emprego de plantas usadas em fitoterapia no Nordeste do Brasil**. Fortaleza: Imprensa Universitária, 2000
- MATOS, F. J.A., **Introdução à fitoquímica experimental**. UFC Edições. p. 44-46, 1997.
- MATTHEWS, D. J.; EMSON, C. L.; MCKENZIE, G. J.; JOLIN, H. E.; BLACKWELL, J. M.; MCKENZIE, A. N. IL-13 is a susceptibility factor for *Leishmania major* infection. **The Journal of Immunology**, v. 164, p. 1458–1462. 2000.
- MEHEUS, F.; BALASEGARAM, M.; OLLIARO, P.; SUNDAR, S.; RIJAL, S.; FAIZ, M.D.; BOELAERT, M. Cost-effectiveness analysis of combination therapies for visceral leishmaniasis in the Indian subcontinent. **PLoS**. 2010.
- MELBY, C.P.; CHANDRASEKAR, B.; ZHAO, W.; COE, E. The hamster as a model of human visceral leishmaniasis: progressive disease and impaired generation of nitric oxide in the face of a prominent Th1-like cytokine response. **J Immunol**. 166: 1912-1920. 2001.
- MELBY, P.C.; TRYON, V.V.; CHANDRASEKAR, B.; FREEMAN, G.L. Cloning of Syrian hamster (*Mesocricetus auratus*) cytokine cDNAs and analysis of cytokine mRNA expression in experimental visceral leishmaniasis. **Infect Immun**, v.66, p. 2135-2142. 1998.



- MOHRS, M.; HOLSCHER, C.; BROM- BACHER, F. Interleukin-4 receptor alpha-deficient BALB/c mice show an unimpaired Thelper2 polarization in response to *Leishmania major* infection. **Infection and Immunity**, v.68, p.1773–1780. 2000.
- MONTANARI, C. A. & BOLZANI, V. S. Planejamento racional de fármacos baseado em produtos naturais. **Química Nova**, v. 24, p. 105-111, 2001.
- MONZOTE, L. Current Treatment of Leishmaniasis: A Review. **The Open Antimicrobial Agents Journal**, v.1, p.9-19. 2009.
- MORAIS, S. M. ; *et al.* Plantas medicinais usadas pelos índios Tapebas do Ceará. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 15, p. 169-177, 2005.
- MOREIRA, R. C. R.; COSTA, G. C.; LOPES, T. C.; BEZERRA, J. L.; GUERRA, R. N. M.; REBELO, J. M. M.; RIBEIRO, M. N. S.; NASCIMENTO, F. R. F.; COSTA, J. M. L. Efeito leishmanicida *in vitro* da *Stachytarpheta cayennensis* (Rich) Vahl (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 17, p. 59-63, 2007.
- MOSMANN, T. R.; CHERWINSKI, H.; BOND, M. W.; GIEDLIN, M. A.; COFFMAN, R. L. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **J. Immunol.**, v. 136, n. 7, p. 2348-2357, 1986.
- MURRAY, H. W.; TSAI, C. W.; LIU, J.; MA, X. Visceral *Leishmania donovani* infection in interleukin- 13-/- mice. **Infection and Immunity**, v.74, p.2487–2490. 2006.
- MURTHY, P. S.; RAMALAKSHMI, K.; SRINIVAS, P. Fungitoxic activity of Indian borage (*Plectranthus amboinicus*) volatiles. **Food Chemistry**, v. 14, p. 1014-1-18, 2009.
- NEAL, R. A. & HALE, C. A comparative study of susceptibility of inbred and outbred mouse strains compared with hamsters to infection with New World cutaneous Leishmaniasis. **The Jour. of Parasit.**, v. 87, p. 7-13, 1983.
- NOVAIS, F. O.; SANTIAGO, R. C.; BAFICA, A.; KHOURI, R.; AFONSO, L.; BORGES, V. M.; BRODSKY, C.; BARRAL-NETTO, M.; BARRAL, A.; DEOLIVEIRA, C. I. Neutrophils and macrophages cooperate in host resistance against *Leishmania braziliensis* infection. **The Jour. of Immun.**, v.183, p. 8088-8098, 2009
- OECD. Organization for Economic Cooperation and Development. **Guideline for Testing of Chemicals: Acute oral toxicity – Acute Toxic Class Method**. Paris: OEDC, Guideline. p. 423, 2001.
- OLIVEIRA, D.A.S.; FIGUEIREDO, M.F.; BRAGA, P.E.T. Perfil epidemiológico dos casos de leishmaniose tegumentar americana na serra da meruoca, Ceará, no período de 2001 a 2012. **S a n a r e**, Sobral, V.13, n.2, p.36-41, 2014.
- OLIVEIRA, F.F.M. Efficacy of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng in a Murine Model of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Skin Abscesses. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 2013.
- OLIVEIRA, L.F.; SCHUBACH, A.O.; MARTINS, M.M.; PASSOS, S.L.; OLIVEIRA, R.V.; MARZOCHI, M.C.; ANDRADE, C.A. Systematic review of the adverse effects of cutaneous leishmaniasis treatment in the New World. **Acta Tropica**, 118, p.87-96, 2011.

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

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Global Health Observatory data repository. Number of cases of cutaneous leishmaniasis reported. Última atualização 14.12.2016. Disponível em: <http://apps.who.int/gho/data/node.main.NTDLEISHCNUM?lang=en> Acessado em: 27.01.2017.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE (WHO -World Health Organization) **The world medicines situation 2011**. Traditional medicines: global situation, issues and challenges. Geneva. p. 12, 2011.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. **Control de las leishmaniasis**: informe de una reunión del Comité de Expertos de la OMS sobre el Control de las Leishmaniasis, Ginebra, 2010.

OMS. ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DE SAÚDE. Leishmaniasis. 2015. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/> Acesso em: 15 de outubro de 2015.

OSORIO, Y.; MELBY, P.C.; PIRMEZ, C.; CHANDRASEKAR, B.; GUARÍN, N.; TRAVI, B.L. The site of cutaneous infection influences the immunological response and clinical outcome of hamsters infected with *Leishmania panamensis*. **Parasite Immunol.** 25:139-148, 2003.

PACE, D. Leishmaniasis. **Jour. of Infect.**, v. 69, p. 10-18, 2014.

Pan American Health Organization (PAHO): Leishmaniasis: Epidemiological Report in the

PARRA, V.; RUIZ, R.A. *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng (Óregano Francês). Estúdio toxigeno de um extracto fuido y del aceite esencial. **Rev. Cubana de Plant Med.** v. 2, p. 68-73, 1999.

PEARSON, R.D. & SOUSA, A.Q. Clinical spectrum of Leishmaniasis. **Clin. Infect. Dis.** v. 22, p. 1-13, 1996.

PEARSON, R.D.; SOUSA, A.Q.; JERONIMO, S.M.B. *Leishmania* species: visceral (kala-azar), cutaneous, and mucosal leishmaniasis. In:\_\_\_\_\_ Mandell, G. L.; Bennett, J.; Dolin, R. (eds) **Principles and Practice of Infections Diseases**. 5th ed., New York: Churchill Livingstone, v.2, p. 2832-2845, 2000.

PEREIRA, I. O. et al. Leishmanicidal activity of benzophenones and extracts from *Garcinia brasiliensis* Mart. Fruits. **Phytomed.** v. 17, p. 339-345, 2010.

PETERSON, R. A. Regulatory T-cells: diverse phenotypes integral to immune homeostasis and suppression. **Toxicol. Pathol.** v.40, p.186–204, 2012.

PIRMEZ, C., YAMAMURA, M., UYEMURA, K., PAES-OLIVEIRA, M., CONCEICAO-SILVA, F.; MODLIN, R. L. Cytokine patterns in the pathogenesis of human Leishmaniasis. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 91, p. 1390–1395, 1993.

QADOUMI, M.; BECKER, I.; DONHAUSER, N.; ROLLINGHOFF, M.; BOGDAN, C. Expression of Inducible Nitric Oxide Synthase in Skin Lesions of Patients with American Cutaneous Leishmaniasis. **Infect. and Immun.**, v. 70, n. 8, p. 4638-4642, 2002.

- RAMU, G., MOHAN, G.K., JAYAVEERA, K.N., DHANAPAL, S.P., & SENTHILKUMAR, G. Preliminary phytochemical and antioxidant study of hydroalcoholic extracts from selected genera of Indian Lamiaceae. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 2, p.685–688, 2012.
- RIBEIRO-GOMES, F. *et al.* Macrophage Interactions with Neutrophils Regulate *Leishmania major* Infection. **The Jour. of Immun.**, v. 172, p. 4454-4462, 2004.
- RIÇA-CAPELA, M.J; CORTES, S.; LEANDRO, C.; PELETEIRO, M.C.; SANTOS-GOMES, G.; CAMPINO, L. Immunological and histopathological studies in a rodent model infected with *Leishmania infantum* promastigotes or amastigotes. **Parasitol Res.** v. 89, p. 163-169, 2003.
- RICE, L. J. ; *et al.* Plectranthus: A plant for the future?. **South African Journal of Botany**, p. 1-13, 2011.
- RIJO, P., CHUMBO, J., OLIVEIRA, A., COSTA, M.C., RODRÍGUEZ, B., & SIMÕES, M.F. Antioxidant activity of two abietane diterpenoids from *Plectranthus* spp. **INETI – Posters**. [disponível em <http://hdl.handle.net/10400.9/912> a 11-05-2014]. 2009.
- ROBERTS, M.T. Current understandings on the immunology of leishmaniasis and recent developments in prevention and treatment. **Br. Med. Bull.**, 75-76:115-130; 2005.
- ROCHA, F. J. S.; SCHLEICHER, U.; MATTNER, J.; ALBER, G.; BOGDAN, C. Cytokines, signaling pathways, and effector molecules required for the control of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in mice. **Infect. Immun.**, v. 75, n. 8, p. 3823-3832, 2007.
- ROJAS, E. & SCORSA, J.V.. *Leishmania braziliensis*: aislamiento de lesiones por inoculación de hámsters com e sin adición de lisado de glândulas de *Lutzomia youngi*. **Rev Saude Publica**, v. 29, p 1-5, 1995.
- RONDON, F.C.M. **Desenvolvimento de fitoterápicos para o tratamento da leishmaníase visceral**. Tese. Fortaleza. Universidade Estadual do Ceará. p. 137, 2011.
- SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology**, v.2, p.845–858, 2002.
- SAUVAIN, M.; KUNESCH, N.; POISSON, J.; GANTIER, J.C.; GAYRAL, P. AND DEDE, J.P.. Isolation of leishmanicidal triterpenes and lignans from the Amazonian liana *Dolioscarpus dentatus* (dilleniaceae). **Phytotherapy Research**. v.10:1, p. 1–4, 1996.
- SCHNORR, D; MUNIZ, A.C.; PASSOS, S; GUIMARAES, L.H.; LAGO, E.L.; BACELLAR, O; GLESBY, M.J.; CARVALHO, E.M. IFN- $\gamma$  Production to *Leishmania* Antigen Supplements the *Leishmania* Skin Test in Identifying Exposure to *L. braziliensis* Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 12, p.1947, December, 2012.
- SEIFERT, K. & CROFT, S. L. *In vitro* and *in vivo* interactions between miltefosine and other antileishmanial drugs. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 50, p. 73-79, 2004.
- SILVA, J.C.F. **Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA), nos municípios de Crato, Juazeiro do Norte e Barbalha, Estado do Ceará, Brasil, 2003-2005** Dissertação. Fortaleza: Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Medicin. p.67, 2009.

SOARES, D. C.; PEREIRA, C. G.; MEIRELES, M. A. A.; SARAIVA, E. M. Leishmanicidal activity of supercritical fluid fraction from *Tabernaemontana catharinensis*. **Parasitology International**, v. 56, p. 135-139, 2007.

SOARES, D.C.; PEREIRA, C.G.; MEIRELES, M.A.A. SARAIVA, E.M. Leishmanicidal activity of a supercritical fluid fraction obtained from *Tabernaemontana catharinensis*, **Parasitology International**, v. 56, p. 135-141. 2007.

SOSA, M. R.; ROSAS, L. E.; MCKENZIE, A. N.; SATOSKAR, A. R. IL-13 gene deficient mice are susceptible to cutaneous *L. mexicana* infection. **European Journal of Immunology**, v. 31, p. 3255–3260, 2001.

SOTO, J. et al. Miltefosine for New World cutaneous leishmaniasis. **Clinical infections disease**, v. 38, p. 266-1267, 2004.

SOUZA, A. S.; GIUDICE, A.; PEREIRA, J. M. B.; GUIMARÃES, L. H.; DE JESUS, A. R.; DE MOURA, T. R.; WILSON, M. E.; CARVALHO, E. M.; ALMEIDA, R. P. Resistance of *Leishmania (Viannia) braziliensis* to nitric oxide: correlation with antimony therapy and TNF- $\alpha$  production. **BMC Infect. Disease.**, v. 10, n. 209, p. 1-11, 2010.

STAGER, S.; ALEXANDER, J.; CARTER, K. C.; BROMBACHER, F.; KAYE, P. M. Both interleukin-4 (IL- 4) and IL-4 receptor alpha signaling contribute to the development of hepatic granulomas with optimal antileishmanial activity. **Infection and Immunity**, v.71, p.4804–4807, 2003.

STAGER, S.; ALEXANDER, J.; KIRBY, A. C.; BOTTO, M.; ROOIJEN, N. V.; SMITH, D. F.; BROMBACHER, F.; KAYE, P. M. Natural antibodies and complementare endogenous adjuvants for vaccine-induced CD8+ T-cell responses. **Nature Medicine**, v.9, p.1287–1292, 2003.

SUNDAR, S. & CHAKRAVARTY, J. Antimony Toxicity. **Int J Environ Res Public Health**.7:4267-77, 2010.

TASDEMIR, D.; KAISER, M.; BRUN, R. et al., “Antitrypanosomal and antileishmanial activities of flavonoids and their analogues: in vitro, in vivo, structure-activity relationship, and quantitative structure-activity relationship studies,” **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 50, no. 4, p. 1352–1364, 2006.

TASWELL, C. Limiting dilution assays for the determination of immunocompetent cell frequencies III. Validity tests for the single-hit Poisson model. **J. Immunol. Meth.**, v. 72, p. 29-40, 1984.

TEIXEIRA, A.P., BATISTA, O., SIMÕES, M.F., NASCIMENTO, J., DUARTE, A., DE LA TORRE, M. C., & RODRÍGUEZ, B. Abietane diterpenoids from *Plectranthus grandidentatus*. **Phytochemistry**, v. 44, p.325–327, 1997.

TEIXEIRA, M. J. **Avaliação do efeito leishmanicida *in vitro* e *in vivo* de constituintes químicos ativos derivados de plantas medicinais**. Fortaleza. Universidade Federal do Ceará. p. 73,1999.

TEMPONE, A.G. et al. Brazilian flora extracts as source of novel antileishmanial and antifungal compounds. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 103(5): p. 443-449, 2008.

- TITUS, R.G., CEREDIG, R.; CEROTTINI, J. C.; LOUIS, J. A. Therapeutic effect of antiL3T4 monoclonal antibody GK 1.5 on cutaneous leishmaniasis in genetically – susceptible BALB/c mice. **The Jour. of Immuno.** v.135, p. 2108-2114, 1985.
- TORRES-SANTOS, E. C. et al. Selective effect of 20,60-di-hydroxy-40-methoxy chalcone isolated from Piper aduncum on Leishmania amazonensis. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 43, p. 1234–1241, 1999.
- TRAVI, B.; OSORIO, Y.; MELBY, P.; CHANDRASEKAR, B.; ARTEAGA, L.; SARAVIA, N. Gender is a major determinant of the clinical evolution and immune response in hamsters infected with *Leishmania spp.* **Infect. Immun** 70:2288-2296. 2002.
- TRIPATHI, P.; SINGH, V.; NAIK, S. Immune response to Leishmania: paradox rather than paradigm. **Immunology & Medical Microbiology**, v.51, p.229-242. 2007.
- TULADHAR, R.; NATARAJAN, G.; SATOSKAR, A. R. Role of Co-stimulation in Leishmaniasis. **Revista Internatio. Jour. of Biolog. Scien.**, v. 7, n. 9, p. 1382-1390, 2011.
- VARGAS-INCHAUSTEGUI, D. A.; XIN, L.; SOONG, L. *Leishmania braziliensis* infection induces dendritic cell activation, ISG15 transcription, and the generation of protective immune responses. **The Jour. of Immun.**, v. 180, n. 11, p. 7537-7545, 2009.
- VON STEBUT, E.; BELKAID, Y.; JAKOB, T.; SACKS, D. L.; UDEY, M. C. Uptake of *Leishmania major* amastigotes results in activation and interleukin 12 release from murine skin-derived dendritic cells: implications for the initiation of anti- *Leishmania* immunity. **The Journal of Experimental Medicine**, v.18, 2007.
- WELLSOW, J., GRAYER, R.J., VEITCH, N.C., KOKUBUN, T., LELLI, R., KITE, G. C., & SIMMONDS, M.S.J. Insect-antifeedant and antibacterial activity of diterpenoids from species of *Plectranthus*. **Phytochemistry**, v. 67, p. 1818–1825, 2006.
- WHO, WORLD-HEALTH-ORGANIZATION.-. Leishmaniasis: worldwide epidemiological and drug access update, 2012.



## APÊNDICE A

### DEPÓSITO DE PATENTE

Tratamento intralesional de Hamsters infectados com *Leishmania braziliensis*.

\* Usa exclusivo do INPI \*


 15/01/2014 013:4900000  
 12-03 DECE  
 BR 10 2014 000955 6

Espaço reservado para o protocolo      Espaço reservado para o número      Espaço reservado para o código QR


**INPI** INSTITUTO NACIONAL DA PROPRIEDADE INDUSTRIAL  
 Sistema de Gestão da Qualidade  
 Diretoria de Patentes

<b>DIRPA</b>	Tipo de Documento <b>Formulário</b>	DIRPA	Página 1/3
Título do Documento <b>Depósito de Pedido de Patente</b>		Classif. <b>FQ001</b>	Versão <b>2</b>
		Processamento <b>DIRPA-PQ001</b>	

**Ao Instituto Nacional da Propriedade Industrial:**  
O requerente solicita a concessão de um privilégio na natureza e nas condições abaixo indicadas.

1. **Depositante (71):**

1.1 Nome: UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ

1.2 Qualificação: INSTITUIÇÃO DE ENSINO SUPERIOR

1.3 CNPJ/CPF: 07272636000133

1.4 Endereço Completo: AV. DA UNIVERSIDADE 2853, BENFICA

1.5 CEP: 60020180

1.6 Telefone: 85-33669434      1.7 Fax: 85-33669941

1.8 E-mail: [sema@ufc.br](mailto:sema@ufc.br)

continua em folha anexa

2. **Natureza:**     Invenção       Modelo de Utilidade       Certificado de Adição

3. **Título da Invenção ou Modelo de Utilidade (54):**

\*PROCESSO DE TRATAMENTO INTRA-LESIONAL DE HAMSTERS INFECTADOS POR LEISHMANIA BRAZILIENSIS COM ANTRONUM FRAXINIFOLIUM\*

continua em folha anexa

4. **Pedido de Divisão: do pedido N°**      **Data de Depósito:**

5. **Prioridade:**     Interna (06)       Internacional (30)

O depositante reivindica a(s) seguinte(s):

País ou Organização do depósito      Número do depósito (se disponível)      Data de depósito

continua em folha anexa

**APÊNDICE B**

**ARTIGOS E COMUNICAÇÕES**

**2012-2016**

---



---

### Artigos completos publicados em periódicos

---

GONÇALVES, T. B.; BRAGA, MILENA AGUIAR ; DE OLIVEIRA, FRANCISCO F.M. ; SANTIAGO, GILVANDETE M.P. ; CARVALHO, CIBELE B.M. ; CABRAL, PAULA BRITO E ; SANTIAGO, THIAGO DE MELO ; SOUSA, JEANLEX S. ; BARROS, E. B. ; NASCIMENTO, RONALDO FERREIRA DO ; NAGAO-DIAS, APARECIDA T. **Effect of subinhibitory and inhibitory concentrations of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng essential oil on *Klebsiella pneumoniae***. *Phytomedicine* (Stuttgart), v. 19, p. 962-968, 2012.

DE OLIVEIRA, FRANCISCO FÁBIO MARTINS ; TORRES, ALBA FABIOLA ; GONÇALVES, T. B. ; SANTIAGO, GILVANDETE MARIA PINHEIRO ; DE CARVALHO, CIBELE BARRETO MANO ; AGUIAR, MILENA BRAGA ; CAMARA, LILIA MARIA CARNEIRO ; RABENHORST, S. H. B. ; MARTINS, ALICE MARIA COSTA ; VALENÇA JUNIOR, José Telmo ; NAGAO-DIAS, APARECIDA TIEMI . **Efficacy of *Plectranthus amboinicus* (Lour.) Spreng in a Murine Model of Methicillin-Resistant *Staphylococcus aureus* Skin Abscesses**. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine* (Print), v. 2013, p. 1-9, 2013.

CABRAL, PAULA BRITO E ; JÚNIOR, JOSÉ EVANDRO CUNHA ; MACEDO, ALEXANDRE CASIMIRO DE ; ALVES, ALEXANDRE RODRIGUES ; GONÇALVES, T. B. ; CABRAL, TEREZA CRISTINA BRITO E ; GONDIM, ANA PAULA SOARES ; PINTO, MARIA ISABEL MORAES ; OSEKI, KAREN TUBONO ; CAMARA, LILIA MARIA CARNEIRO ; RABENHORST, S. H. B. ; NAGAO-DIAS, APARECIDA TIEMI. **Anti-PGL1 salivary IgA/IgM, serum IgG/IgM, and nasal *Mycobacterium leprae* DNA in individuals with household contact with leprosy**. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 17, p. 1005-1010, 2013.

A NETO, J. B. ; SILVA, C. R. ; GONÇALVES, T. B. ; Nagao AT ; CARVALHO, T. M. J. P. ; Magalhães HLF ; MORAES, M. A. ; Nobre Jr HV. **Screening of Antimicrobial Metabolite Yeast Isolates Derived Biome Ceará against Pathogenic Bacteria, Including MRSA: Antibacterial Activity and mode of Action Evaluated by Flow Cytometry**. *INTERNATIONAL JOURNAL CURRENT MICROBIOLOGY AND APPLIED SCIENCES*, v. 4, p. 459-472, 2015.

SANTOS, N. O. ; GONÇALVES, T. B. **AVALIAÇÃO MICROBIOLÓGICA DAS MÃOS DE MANIPULADORES DE ALIMENTOS EM CRECHES DA CIDADE DE JUAZEIRO DO NORTE, CE**. *Interfaces: Saúde, Humanas e Tecnologia*, v. 3, p. 3-8, 2015.

---

### Capítulos de livros publicados

---

GONÇALVES, T. B. **Virulence Mechanisms of the *Klebsiella***. In: Lucy A. Pereira and Andrey Santos. (Org.). *Klebsiella Infections: Epidemiology, Pathogenesis and Clinical Outcomes*. 1ed.: Nova Science Publishers, v. , p. 187-208. 2013.

---

### Patentes e registros

---

LIMA, S. C.; GONÇALVES, T. B.; TEIXEIRA, M. J.; NAGAO-DIAS, A. T. *Processo de tratamento intralesional de hamsters infectados por Leishmania braziliensis com Astronium fraxinifolium*. 2014, Brasil.

Patente: Modelo de Utilidade. Número do registro: BR1020140009558, título: "Processo de tratamento intralesional de hamsters infectados por *Leishmania braziliensis* com *Astronium fraxinifolium*", Instituição de registro: INPI - Instituto Nacional da Propriedade Industrial. Depósito: 15/01/2014

---

**Resumos publicados em Anais de congressos**

---

LIMA, M. O. ; SOARES, F. J. P. R. ; LIMA, R. S. P. ; GONÇALVES, T. B. . Infecção urinária como predisponente ao desenvolvimento da síndrome da angustia respiratória aguda (SARA) durante a gestação: Revisão bibliográfica. In: III Congresso Cariariense de Biomedicina, 2016, Juazeiro do Norte. III Congresso Cariariense de Biomedicina, 2016.

GONÇALVES, T. B.; TEIXEIRA, M. J. ; NAGAO-DIAS, A. T. Influência do sítio de inoculação na imunopatogênese da leishmaniose cutânea por leishmania braziliensis em hamste. In: XXIV CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA - SBP e do XXIII CONGRESO LATINOAMERICANO DE PARASITOLOGÍA - FLAP, 2015, Salvador. XXIV CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA - SBP e do XXIII CONGRESO LATINOAMERICANO DE PARASITOLOGÍA - FLAP, 2015.

GONÇALVES, T. B.; TEIXEIRA, M. J. Tratamento com CXCL10 reduz TGF- $\beta$  e IL-10 em camundongos BALB/C infectados por Leishmania infantum. In: XXIV CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA - SBP e do XXIII CONGRESO LATINOAMERICANO DE PARASITOLOGÍA - FLAP, 2015, salvador. XXIV CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA - SBP e do XXIII CONGRESO LATINOAMERICANO DE PARASITOLOGÍA - FLAP, 2015.

GONÇALVES, T. B.; TEIXEIRA, M. J. CXCL10 induz in vivo uma resposta protetora em macrófagos infectados por L. braziliensis resistente ao antimônio. In: XXIV CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA - SBP e do XXIII CONGRESO LATINOAMERICANO DE PARASITOLOGÍA - FLAP, 2015, salvador. XXIV CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA - SBP e do XXIII CONGRESO LATINOAMERICANO DE PARASITOLOGÍA - FLAP, 2015.

GONÇALVES, T. B.; TEIXEIRA, M. J. ; NAGAO-DIAS, A. T. Avaliação do tratamento com plectranthus amboinicus in vitro e in vivo frente à leishmania braziliensis. In: XXIV CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA - SBP e do XXIII CONGRESO LATINOAMERICANO DE PARASITOLOGÍA - FLAP, 2015, salvador. XXIV CONGRESSO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PARASITOLOGIA - SBP e do XXIII CONGRESO LATINOAMERICANO DE PARASITOLOGÍA - FLAP, 2015.

GONÇALVES, T. B.; BRAGA, M.A. ; RODRIGUES, N. L. C. ; DUTRA, B. M. ; TEIXEIRA, M. J. ; SANTIAGO, G. M. P. ; NAGAO-DIAS, A. T. . ATIVIDADE DA FRAÇÃO ACETATO DE PLECTRANTHUS AMBOINICUS CONTRA AS FORMAS PROMASTIGOTAS E AMASTIGOTAS DE LEISHMANIA (VIANNIA) BRAZILIENSIS.. In: 51º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical - MEDTROP, 2015, Fortaleza. 51º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical - MEDTROP, 2015.

GONÇALVES, T. B.; FONSECA, F. R. M. ; MONTEIRO, M. L.; SANTIAGO, G. M. P. ; FIGUEIREDO, W. M. E. ; TEIXEIRA, M. J. ; NAGAO-DIAS, A. T. AVALIAÇÃO DO TRATAMENTO COM PLECTRANTHUS AMBOINICUS EM HAMSTER INFECTADOS COM LEISHMANIA BRAZILIENSIS. In: 51º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical - MEDTROP, 2015, fortaleza. 51º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical - MEDTROP,, 2015.

RODRIGUES, N. L. C. ; TEIXEIRA, M. J. ; FONSECA, F. R. M. ; DUTRA, B. M. ; GONÇALVES, T. B. ; FIGUEIREDO, W. M. E. ; QUEIROZ, J. A. N. CXCL10 modula a resposta inflamatória em macrófagos murinos infectados por L. braziliensis resistente ao antimônio. In: 51º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical - MEDTROP, 2015, fortaleza. 51º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical - MEDTROP, 2015.

PEREIRA, A. A. ; FERREIRA, J. R. ; ANDREZA, R. S. ; GONÇALVES, T. B. . Análise microbiológica das cozinhas dos ranchos e hospedarias romeiras de cidade de juazeiro do norte, Ceará.. In: I Congresso Cariariense de Biomedicina, 2014, Juazeiro do Norte. I Congresso Cariariense de Biomedicina, 2014.

ANDREZA, R. S. ; FERREIRA, C. T. Q. ; SOUZA, C. A. O. ; GONCALVES, D. P. ; SILVA, E. M. S. ; SILVA, J. V. ; GONÇALVES, T. B. . Avaliação Microbiológica e Parasitológica das mãos de manipuladores de carnes dos mercados públicos da cidade de Juazeiro do Norte, Ceará.. In: I Congresso Cariense de Biomedicina, 2014, Juazeiro do Norte. I Congresso Cariense de Biomedicina, 2014.

DUTRA, B. M. ; TEIXEIRA, M. J. ; GONÇALVES, T. B. . Efeito de CXCL-10 em camundongos BALB/C infectados com cepa de *L. braziliensis* refratária ao tratamento com antimônio.. In: 50º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical., 2014, Rio Branco - AC. 50º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical., 2014.

Vasconcelos LMF ; Teixeira FM ; RODRIGUES, R. O. ; BRAGA, M.A. ; GONÇALVES, T. B. ; Almeida TLP ; NAGAO-DIAS, APARECIDA T. . Skin testing in patients with a history of hypersensitivity by drug in a tertiary level Brazilian hospital. In: 11th World Congress on Inflammation, 2013, Natal. 11th World Congress on Inflammation, 2013.

RODRIGUES, R. O. ; Carvalho PG ; GONÇALVES, T. B. ; BRAGA, M.A. ; RABENHORST, S. H. ; NAGAO-DIAS, APARECIDA T. . Interleukin 10 polymorphism 1082-A in patients infected with HIV and allergic to efavirenz.. In: 11th World Congress on Inflammation, 2013, Natal. 11th World Congress on Inflammation, 2013.

GONÇALVES, T. B.; BRAGA, M.A. ; RODRIGUES, R. O. ; Oliveira FFM ; Cunha JE ; Vasconcelos LMF ; SANTIAGO, GILVANDETE M.P. ; NAGAO-DIAS, APARECIDA T. . . Effect of *Plectranthus amboinicus* Lour Spreng lamiaceae essential oil using as marker of the exotoxin A expression of the *P. aeruginosa*. In: 11th World Congress on Inflammation, 2013, Natal. 11th World Congress on Inflammation, 2013.

BRAGA, M.A. ; GONÇALVES, T. B. ; Oliveira FFM ; RODRIGUES, R. O. ; SANTIAGO, GILVANDETE M.P. ; Valença JT ; Vasconcelos LMF ; NAGAO-DIAS, APARECIDA T. . Evaluation of *Plectranthus amboinicus* Lour Spreng in inflammation in murine model of methicillin-resistant *S. aureus* skin abscess. In: 11th World Congress on Inflammation, 2013, Natal. 11th World Congress on Inflammation, 2013.

GONÇALVES, T. B.; GOMES, S. C. ; BRAGA, M.A. ; TEIXEIRA, M. J. ; RODRIGUES, R. O. ; NAGAO-DIAS, A. T. . Avaliação da atividade Leishmanida in vitro de extratos etanólicos da casca de *Astronium fraxinifolium* frente a *Leishmania (Viannia) braziliensis*. In: III Simpósio Internacional de plantas medicinais e nutracêuticos e III Conferência do instituto nacional de ciências e tecnologias de frutos tropicais, 2012, Aracaju - SE. III Simpósio Internacional de plantas medicinais e nutracêuticos e III Conferência do instituto nacional de ciências e tecnologias de frutos tropicais, 2012.

GONÇALVES, T. B.; GOMES, S. C. ; BRAGA, M.A. ; TEIXEIRA, M. J. ; RODRIGUES, R. O. ; NAGAO-DIAS, A. T. . Avaliação da atividade Leishmanida in vitro de extratos etanólicos da casca de *Astronium fraxinifolium* frente a *Leishmania (Viannia) braziliensis*. In: III Simpósio Internacional de plantas medicinais e nutracêuticos e III Conferência do instituto nacional de ciências e tecnologias de frutos tropicais, 2012, Aracaju - SE. III Simpósio Internacional de plantas medicinais e nutracêuticos e III Conferência do instituto nacional de ciências e tecnologias de frutos tropicais, 2012.

GONÇALVES, T. B.; BRAGA, M.A. ; CARVALHO, C B M ; SANTIAGO, G. M. P. ; NAGAO-DIAS, A. T. . Atividade Bactericida do óleo essencial de *Plectranthus amboinicus* contra *Enterococcus faecalis* e *Enterococcus faecium*. In: III Simpósio Internacional de plantas medicinais e nutracêuticos e III Conferência do instituto nacional de ciências e tecnologias de frutos tropicais, 2012, Aracaju -SE. III Simpósio Internacional de plantas medicinais e nutracêuticos e III Conferência do instituto nacional de ciências e tecnologias de frutos tropicais, 2012.



## ANEXO A

---

### COMITÊ DE ÉTICA

---

Documento de aprovação do projeto de tese pelo Comitê de Ética para Pesquisa Animal da Universidade Federal do Ceará (CEPA/UFC) em 12 de dezembro de 2011 através do protocolo 75/2011.



Universidade Federal do Ceará  
Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA  
Rua: Coronel Nunes de Melo, 1127 Rodolfo Teófilo  
Cep: 60430-970 Fortaleza-CE  
Tel: (85) 3366.8331 Fax: (85) 3366.8333

### DECLARAÇÃO

Declaramos que o protocolo para uso de animais em experimentação n° 75/2011, sobre o projeto intitulado: “**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA DA CASCA E ENTRECASCA DA ASTRONIUM FRAXINIFOLIUM E DO ÓLEO ESSENCIAL DA PLECTRANTHUS AMBOINICUS**”, de responsabilidade de APARECIDA TIEMI NAGÃO DIAS, está de acordo com os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

Declaramos ainda que o referido projeto foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA – em reunião realizada em 07 de dezembro de 2011.

Fortaleza, 12 de dezembro de 2011

  
Prof. Dra. Nylane Maria Nunes de Alencar  
Coordenadora da Comissão de Ética em Pesquisa Animal – CEPA