



Universidade do Estado do Rio de Janeiro
Centro Biomédico
Faculdade de Ciências Médicas

Rosiane Freire dos Santos

**Ação terapêutica e moduladora da quercetina na leishmaniose tegumentar
experimental por *Leishmania braziliensis* e *Leishmania major***

Rio de Janeiro

2017

Rosiane Freire dos Santos

**Ação terapêutica e moduladora da quercetina na leishmaniose tegumentar experimental
por *Leishmania braziliensis* e *Leishmania major***

Tese apresentada, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Silvia Amaral Gonçalves da Silva

Rio de Janeiro

2017

CATALOGAÇÃO NA FONTE
UERJ/REDE SIRIUS/CBA

S237 Santos, Rosiane Freire dos.

Ação terapêutica e moduladora da quercetina na leishmaniose tegumentar experimental por *Leishmania braziliensis* e *Leishmania major* / Rosiane Freire dos Santos – 2017.

139 f.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Silvia Amaral Gonçalves da Silva.

Tese (Doutorado em Microbiologia) – Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Faculdade de Ciências Médicas.

1. *Leishmania braziliensis* – Teses. 2. Quercetina – Uso terapêutico. 3. Imunomodulação. 4. Hamster como animal de laboratório – Teses. 4. I. Silva, Silvia Amaral Gonçalves da. II. Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Faculdade de Ciências Médicas. III Título

CDU 616.993.161

Bibliotecária: Thais Ferreira Vieira - CRB/7 5302

Autorizo apenas para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, desde que citada a fonte.

Assinatura

Data

Rosiane Freire dos Santos

**Ação terapêutica e moduladora da quercetina na leishmaniose tegumentar experimental
por *Leishmania braziliensis* e *Leishmania major***

Tese apresentada como requisito parcial para obtenção do título de Doutor, ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia, da Universidade do Estado do Rio de Janeiro. Área de concentração: Microbiologia Médica.

Aprovada em 26 de junho de 2017.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Silvia Amaral Gonçalves da Silva

Faculdade de Ciências Médicas – UERJ

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Alexandre Bello

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof^ª. Dra. Patrícia Maria Lourenço Dutra

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof^ª. Dra. Luciana Rodrigues

Faculdade de Ciências Médicas - UERJ

Prof. Dr. Elmo Eduardo de Almeida Amaral

Fundação Oswaldo Cruz

Prof^ª. Dra. Bartira Rossi Bergmann

Universidade Federal do Rio de Janeiro

Rio de Janeiro

2017

DEDICATÓRIA

Aos meus queridos Pais, Roque e Maria do Carmo por me apoiarem incondicionalmente

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus, pela minha vida, por me permitir chegar até aqui e me ensinar a superar e aprender cada dificuldade, guiando sempre meus passos.

Aos meus Pais, por sempre me apoiarem e terem possibilitado as muitas oportunidades que tive na minha vida, pela educação que me deram, pelos bons exemplos que vivenciei, que me ajudaram a formar o ser humano que sou.

À minha família, meus irmãos Roque Júnior e Rose, que especialmente me apoiou e me levantou quando eu precisava. Sua ajuda foi importante para que eu pudesse seguir em frente. Ao meu querido cunhado Edmar, pelas palavras de incentivo. Não posso esquecer da parábola que me contou ainda antes da defesa do mestrado, palavras que me incentivaram muito a prosseguir.

À minha orientadora Dr^a Silvia Amaral, por ter me dado a oportunidade, incentivo e pela compreensão nesses muitos anos de convívio e trabalho. Muito obrigada por todo o auxílio e ensinamentos durante todo esse tempo.

Aos professores do laboratório de Parasitologia, em especial ao prof^o Dr^o Alexandre Bello, por sempre estar disposto a ajudar da melhor forma possível e à prof^a Dr^a Patrícia Dutra, por todo apoio, colaboração e incentivo no decorrer desses anos.

Ao professor Dr^o Elmo Almeida Amaral do laboratório de bioquímica de tripanossomatídeos, IOC/ Fiocruz, pela contribuição com os experimentos de ROS e seus alunos Job Inácio e Luíza Gervazoni.

À professora Dr^a Luciana Rodrigues do laboratório de Imunopatologia do Departamento de Patologia. FCM-UERJ, pela colaboração e paciência com os ensaios de produção de citocinas.

Aos membros da banca pela honra em poder aprender com cada sugestão ou correção que certamente enriquecerão este trabalho.

À professora Wânia Mafro do departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia-UERJ por gentilmente aceitar ser revisora da tese e contribuir grandiosamente para o enriquecimento do trabalho.

Às alunas do laboratório e imunofarmacologia Parasitária, em especial à Luciana Costa por ter me ensinado o “mundo da leishmania”, quando entrei no laboratório. Obrigada por tudo! À amiga Patriquia Amaral por ter me indicado para estagiar no laboratório. Tenho um carinho especial por tudo que vivemos, quando o laboratório estava apenas começando!

Também agradeço as alunas que sempre tiveram dispostas a ajudar e enriquecer meu trabalho de alguma forma, em especial: Andréia, Bianca, Thayssa, Júlia, Thainá que me ajudaram bastante na reta final dos experimentos mantendo um clima agradável e amistoso.

À técnica Michely Mendes, que se tornou uma amiga, por todo apoio, incentivo, ajuda com experimentos, conselhos, previsões de signos, risadas, desabafos. Com certeza, meus dias no laboratório seriam bem diferentes sem você.

Às funcionárias técnicas e auxiliares de laboratório, em especial à Yara e Érika por todo o trabalho por “trás dos bastidores” fundamentais para o prosseguimento dos experimentos, além das conversas agradáveis e produtivas.

À equipe do biotério: Jennif e Nádia, por terem cuidado e atenção com os animais de experimentação, sempre dispostas a ajudar, quando necessário.

À todos os funcionários da UERJ, em especial da disciplina de Parasitologia, que apesar da crise que a assola, lutam e cumprem com suas obrigações com perseverança de dias melhores, o que é fundamental para a continuação da pesquisa científica na Universidade.

Ao apoio financeiro da CAPES e CNPq.

Aos amigos, que fiz pela ciência ou fora dela, que muitas vezes me ouviram falar sobre tese, experimentos, camundongos, laboratório, alguns sem entender muito do que eu estava dizendo ou me ouviram reclamar que o experimento não deu certo, ou que : “a *Leishmania* não cresceu” e tantas outras coisas, vibravam comigo quando o experimento funcionava, mesmo não entendendo muito bem o que funcionou. Obrigada por sempre me ouvirem, me incentivarem nos dias ruins e comemorarem comigo nos dias bons. Em especial: Aline, Girlaine, Rai luz, Juliana, Vivi, Nanda, Karine, Adriane, Renata, Roberta e à Dr^a Vera, que foi uma das que mais me escutou, me incentivando sempre.

Aos amigos “Mestres dos magos”: Simone Sandy, Wagner Lopes e Bruno pelas gargalhadas garantidas em meio às batatas do outback ou dos ‘inexperimentos’.

À todos que contribuíram diretamente ou indiretamente para a conclusão deste trabalho, a minha gratidão.

Il faut bien que je supporte deux ou trois chenilles si je veux connaître les papillons. Il paraît que c'est tellement beau

St-Exupéry

RESUMO

SANTOS, Rosiane Freire dos. **Ação terapêutica e moduladora da quercetina na leishmaniose tegumentar experimental por *Leishmania braziliensis* e *Leishmania major*.** 2017. 139 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

A leishmaniose tegumentar é a forma mais frequente da leishmaniose no Brasil, tendo como agente principal a *Leishmania (Viannia) braziliensis*, que causa a forma clínica cutânea e mucosa, onde há intensa e destrutiva resposta inflamatória na região oronasal. O arsenal terapêutico é restrito, tóxico e em algumas situações, ineficaz. É importante o estudo de novas moléculas com potencial terapêutico para a leishmaniose. O flavonóide quercetina possui atividades biológicas, incluindo ações: anti-inflamatória, antioxidante, pró-oxidante, imunomoduladora e antiparasitária. Em tripanossomatídeos é relatada a sua ação. O objetivo desse estudo foi avaliar a atividade terapêutica e imunomoduladora da quercetina em modelos experimentais de infecção com *L. braziliensis* (em hamster) e *L. major* (em camundongos), uma vez que nestes últimos é bem estabelecido os perfis de resposta imune associado a suscetibilidade (BALB/c) e resistência (C57BL/6). O efeito *in vitro* foi avaliado sobre o crescimento de promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. braziliensis* e *L. major*. A modulação de macrófagos foi avaliada pela produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) usando as sondas H₂DCFDA e *Amplex red* e a produção das citocinas por citometria de fluxo (CBA, *cytometric bead array*). O tratamento *in vivo* dos animais foi realizado pela via oral (gavagem) 5 vezes na semana com 20mg/Kg /40mg/Kg e se iniciaram após 7 dias de infecção ou com a lesão estabelecida durante 7-10 semanas. Em amastigotas de *L. braziliensis* e de *L. major*, a quercetina promoveu inibição no índice de infecção. O tratamento prévio de macrófagos, reduziu o índice de infecção. Macrófagos tratados por 48 h, mostraram um aumento da produção ROS e H₂O₂ com 330 µM de quercetina e quando infectados e tratados por 48h, aumentaram a produção sendo dose-dependente. Houve diminuição dos níveis de IL-6 e TNF e aumento de IL-10 e MCP-1. *In vivo*, o tratamento de hamsters com 20 mg/ kg de quercetina, reduziu o tamanho da lesão e da carga parasitária. O tratamento após a lesão estabelecida não controlou o tamanho da lesão, mas diminuiu a carga parasitária. Em BALB/c infectados com *L. major*, o tratamento com 20 mg/ kg de quercetina diminuiu a carga parasitária e o tratamento com 40 mg/ kg reduziu a lesão e a carga parasitária. Houve aumento da produção de IL-2, IL-4 e IL-6 pelos linfócitos esplênicos. Em C57BL/6, o tratamento com 40 mg/ kg de quercetina promoveu redução da carga parasitária, além de aumentar a produção de IL-10, IL-17, IFN-γ e TNF. Esses resultados mostram que o flavonóide quercetina apresenta atividade antiparasitária em *L. braziliensis* e *L. major*, estimulando a produção de ROS pelos macrófagos ao mesmo tempo que o modula para um estado anti-inflamatório. A ação terapêutica pela via oral sem sinais de toxicidade hepática e renal para os animais demonstram o potencial promissor da quercetina na terapia da leishmaniose.

Palavras chave: *Leishmania braziliensis*. *Leishmania major*. Quercetina. Espécies reativas de oxigênio. Imunomodulação. Tratamento oral. Hamsters. BALB/c. C57BL/6.

ABSTRACT

SANTOS, Rosiane Freire dos. **Therapeutic and modulatory action of quercetin in experimental cutaneous leishmaniasis by *Leishmania braziliensis* and *Leishmania major***. 2017. 139 f. Tese (Doutorado em Microbiologia) - Faculdade de Ciências Médicas, Universidade do Estado do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, 2017.

Tegumentary leishmaniasis is the most frequent form of leishmaniasis in Brazil, with *Leishmania (Viannia) braziliensis*, which causes the cutaneous and mucosal clinical forms, where there is an intense and destructive inflammatory response in the oronasal region. The therapeutic arsenal is restricted, toxic and in some situations ineffective. It is important to study new molecules with therapeutic potential for leishmaniasis. The flavonoid quercetin has biological activities, including actions: anti-inflammatory, antioxidant, pro-oxidant, immunomodulatory and antiparasitic. In trypanosomatids its action is reported. The objective of this study was to evaluate the therapeutic and immunomodulatory activity of quercetin in experimental models of infection with *L.braziliensis* (hamster) and *L.major* (in mice), since in the latter the well-established immune response profiles associated with susceptibility (BALB / c) and resistance (C57BL/ 6). The *in vitro* effect was evaluated on the growth of intracellular promastigotes and amastigotes of *L.braziliensis* and *L. major*. Modulation of macrophages was evaluated by the production of reactive oxygen species (ROS) using the H2DCFDA and Amplex red probes and the cytometric flow cytometry (CBA) production. *In vivo* treatment of the animals was done via the oral (gavage) 5 times a week with 20mg / kg / 40mg / kg and started after 7 days of infection or with the lesion established for 7-10 weeks. In amastigotes of *L.braziliensis* and *L.major*, quercetin promoted inhibition in the infection index. Pretreatment of macrophages has reduced the rate of infection. Macrophage treated for 48 h showed increased ROS and H2O2 production with 330 µM quercetin and when infected and treated for 48 h, increased yield by being dose-dependent. There was a decrease in IL-6 and TNF levels and an increase in IL-10 and MCP-1. *In vivo*, treatment of hamsters with 20 mg / kg quercetin reduced the size of the lesion and the parasitic load. Treatment after established injury did not control lesion size, but decreased parasitic load. In BALB/ c infected with *L.major*, treatment with 20 mg / kg quercetin reduced parasite load and treatment with 40 mg / kg reduced lesion and parasitic load. There was an increase in the production of IL-2, IL-4 and IL-6 by splenic lymphocytes. In C57BL / 6, treatment with 40 mg / kg quercetin reduced the parasite load and increased production of IL-10, IL-17, IFN-γ and TNF. These results show that the flavonoid quercetin shows antiparasitic activity in *L.braziliensis* and *L.major*, stimulating ROS production by macrophages while modulating it to an anti-inflammatory state. Oral therapeutic action with no signs of hepatic and renal toxicity for the animals demonstrates the promising potential of quercetin in the therapy of leishmaniasis.

Keywords: *Leishmania braziliensis*. *Leishmania major*, Quercetin. Oxigen-reactive species.

Immunomodulation. Oral treatment. Hamsters. BALB/c. C57BL/6

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 –	Perfil endêmico das Leishmanioses no Mundo.....	18
Figura 2 –	Esquema das formas evolutivas de <i>Leishmania spp</i>	20
Figura 3 –	Classificação das espécies de <i>Leishmania</i> de acordo com os subgêneros.....	21
Figura 4 –	Ciclo de vida de <i>Leishmania</i>	23
Figura 5 –	Apresentações clínicas da Leishmaniose.....	32
Figura 6 –	Esquemática do perfil de células e citocinas envolvidas no padrão de resistência e suscetibilidade durante a infecção por <i>L. major</i>	36
Figura 7 –	Esquemática do perfil de citocinas do modelo <i>Mesocricetus auratus</i> na infecção por <i>L.donovani</i> e <i>L.braziliensis</i>	38
Figura 8 –	Estrutura química das principais classes de flavonóides.....	48
Figura 9 –	Processo de sequestro de espécies reativas de oxigênio por um flavonóide.....	49
Figura 10 –	Sítio de ligação para metais na estrutura de um flavonóide	51
Figura 11 –	Estrutura química da quercetina	54
Figura 12 –	Principais atividades biológicas da quercetina	55
Figura 13 –	Desenho experimental dos esquemas terapêuticos <i>In vivo</i>	68
Figura 14 –	Atividade sobre o crescimento de formas promastigotas de <i>L.braziliensis</i>	71
Figura 15 –	Viabilidade de macrófagos de hamsters tratados com quercetina.....	72
Figura 16 –	Atividade anti-amastigota da quercetina.....	73
Figura 17 –	Atividade anti-amastigota em macrófagos de Hamster pré- tratados com a quercetina.....	75
Figura 18 –	Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos de hamsters tratados com a quercetina sem infecção.....	76
Figura 19 –	Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos de hamsters infectados e tratados com a quercetina.....	77
Figura 20 –	Efeito do tratamento oral com quercetina em hamsters infectados com <i>Leishmania braziliensis</i>	78
Figura 21 –	Efeito do tratamento oral com quercetina em hamsters infectados com <i>L.braziliensis</i> após a lesão estabelecida.....	80
Figura 22 –	Atividade da quercetina sobre formas promastigotas de <i>L.major</i>	82
Figura 23 –	Viabilidade celular de macrófagos de camundongos BALB/c tratados com quercetina.	83

Figura 24 –	Atividade anti-amastigota da quercetina em <i>L. major</i>	84
Figura 25 –	Avaliação da atividade anti-amastigota da quercetina em macrófagos de camundongos BALB/c tratados por 24 horas antes da infecção.....	85
Figura 26 –	Avaliação da produção de citocinas nos sobrenadantes de macrófagos de camundongos BALB/c infectados com <i>L. major</i>	86
Figura 27 –	Efeito do tratamento oral com quercetina a 20 mg/kg em camundongos BALB/c infectados com <i>Leishmania major</i>	88
Figura 28 –	Efeito do tratamento oral com quercetina (40mg/kg) em camundongos BALB/c infectados com <i>L. major</i>	89
Figura 29 –	Fotografia de camundongos BALB/c infectados com <i>L. major</i> na pata traseira.....	90
Figura 30 –	Produção de citocinas por linfócitos de camundongos BALB/c infectados e tratados com a quercetina.....	91
Figura 31 –	Viabilidade celular de macrófagos de camundongos C57BL/6.....	93
Figura 32 –	Atividade anti-amastigota da quercetina utilizando macrófagos de camundongos C57BL/6	94
Figura 33 –	Efeito do tratamento oral com quercetina (20mg/kg) em camundongos C57BL/6 infectados com <i>L. major</i>	97
Figura 34 –	Efeito do tratamento oral com quercetina (40mg/kg) em camundongos C57BL/6 infectados com <i>L. major</i>	98
Figura 35 –	Produção de citocinas por linfócitos de camundongos C57BL/6 infectados com <i>L. major</i>	100

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 –	Casos de LTA no Brasil. 2006 a 2014.....	19
Tabela 2 –	Fatores de sobrevivência intracelular de <i>Leishmania</i> e seu papel na interação <i>Leishmania</i> -macrófago.....	27
Tabela 3 –	Apresentação clínica, sintomas, principais espécies e áreas afetadas pela Leishmaniose.....	29
Tabela 4 –	Fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose e seu modo de ação.....	41
Tabela 5 –	Espécies de tripanosomatídeos e alvos da quercetina.....	59
Tabela 6 –	Índice de seletividade da quercetina em macrófagos de Hamsters infectados com <i>L. braziliensis</i>	74
Tabela 7–	Índice de seletividade da quercetina em macrófagos de camundongos BALB/c infectados com <i>L. major</i>	84
Tabela 8–	Índice de seletividade da quercetina em macrófagos de camundongos C57BL/6 infectados com <i>L. major</i>	95

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	Alanino aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
APC	Células apresentadoras de antígeno (<i>Presenting antigen cells</i>)
C3b	Opsonina – resultante da clivagem do componente 3 do Sistema Complemento
C3bi	Receptor do componente C3 do Sistema Complemento
CBP	Protease Cisteína B (<i>Cystein Protease B</i>)
CC ₅₀	Concentração Citotóxica para 50%
CO ₂	Dióxido de carbono
COX	Ciclooxigenase
CR	Receptor do complemento (Complement receptor)
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucléico (<i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DNDi	<i>Drugs neglected disease initiative</i>
FDA	<i>Foods and drug administration</i>
gp63	Glicoproteína de 63kD
GIP	Glicoinositolfosfato (<i>Glico inositol phosphate</i>)
GIPLs	Glicoinositolfosfolípidios (<i>Glico inositol phospholipids</i>)
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio (<i>Hydrogen peroxide</i>)
H2DCFDA	2',7'-dichlorodihydrofluorescein diacetate
HIV	Vírus da imunodeficiência humana (<i>Human Immunodeficiency virus</i>)
HPV	Papiloma vírus Humano (<i>Human papiloma virus</i>)
HSP70	Proteína do choque térmico de 70 Kda (<i>The 70 kD heat shock proteins</i>)
IFN- γ	Interferon gama
IC ₅₀	Concentração inibitória de 50 %
IL	Interleucina
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida (<i>Nitric oxide synthases</i>)
ISCL	Inositol fosfofingolípido fosfolipase C- like
LCD	Leishmaniose cutâneo-difusa
LDL	Lipoproteína de baixa densidade (Low density lipoprotein)

LOX	Lipooxigenase
LPG	Lipofosfoglicano
LPS	Lipopolissacarideo
LRV1	Vírus RNA de <i>Leishmania</i> (<i>Leishmania RNA virus 1</i>)
LTA	Leishamiose Tegumentar Americana
MsrA	Metionina sulfose redutase A
MIF	Fator inibitório de migração de macrófagos (<i>macrophage inhibitory factor</i>)
MTT	(3-(4,5-dimetiltiazol-2yl)-2,5-difenil brometo de tetrazolina)
NO	Óxido nítrico (<i>Nitric oxide</i>)
NO ₂	Nitrito
NOX	Nicotinamida-Adenina-Dinucleótido-Fosfato oxidase (NADPH oxidase)
NET	Rede extracelular de neutrófilos (<i>Neutrophils extracellular traps</i>)
OMS	Organização Mundial de Saúde
PBS	Solução de tampão fosfato com cloreto de sódio a 0,9% (<i>Phosphate buffered saline</i>)
PKC	Proteína Cinase C (<i>Protein Kinase C</i>)
RNI	Reativos intermediários de Nitrogênio (<i>Reactive nitrogen intermediaries</i>)
ROS	Espécies reativas de oxigênio (<i>Reactive Oxygen Species</i>)
SERM	<i>Selective estrogen receptor modulators</i>
TCD8 ⁺	Linfócitos citotóxicos
TGF-β	Fator de transformação do crescimento beta (<i>Transforming growth factor beta</i>)
Th	Linfócitos T auxiliares
TNF	Fator de necrose tumoral (<i>Tumor necrosis factor</i>)
TLR	<i>Receptor toll-like</i>
TXNpx	Triparedoxina redutase

LISTA DE SÍMBOLOS

°C –	Graus Celsius
mm –	Milímetro
μg –	Micrograma
μM –	Micromolar
% –	Porcentagem
< –	Menor que
® –	Marca registrada

SUMÁRIO

	INTRODUÇÃO	17
1	OBJETIVOS	61
1.1	Objetivo geral	61
1.2	Objetivos específicos	61
2	METODOLOGIA	62
2.1	Flavonóide quercetina	62
2.2	Parasitas	62
2.2.1	<u>Leishmania braziliensis</u>	62
2.2.2	<u>Leishmania major</u>	62
2.3	Considerações éticas	63
2.4	Animais	63
2.5	Ensaio da ação da quercetina sobre promastigotas	63
2.6	Atividade sobre amastigotas intracelulares	64
2.7	Ação sobre o macrófago	65
2.7.1	<u>Toxicidade</u>	65
2.7.2	<u>Produção de espécies reativas de oxigênio</u>	66
2.7.3	<u>Produção de Peróxido de Hidrogênio</u>	68
2.7.4	<u>Produção de citocinas</u>	68
2.8	Atividade <i>in vivo</i> da quercetina	67
2.8.1	<u>Modelos animais e infecção</u>	67
2.8.2	<u>Tratamento de hamsters infectados com <i>L. braziliensis</i></u>	67
2.8.3	<u>Tratamentos de camundongos BALB/c e C57BL/6</u>	68
2.8.4	<u>Quantificação da carga parasitária</u>	69
2.8.5	<u>Avaliação da produção de citocinas</u>	69
2.8.6	<u>Parâmetros bioquímicos de toxicidade hepática e renal</u>	70
2.9	Análises estatísticas	70
3	RESULTADOS	71
3.1	Atividade da quercetina no modelo de infecção com <i>Leishmania braziliensis</i> 71	
3.1.1	<u>Atividade em promastigotas</u>	71
3.1.2	<u>Avaliação da concentração tóxica para macrófagos de hamsters</u>	72
3.1.3	<u>Atividade anti-amastigota e índice de seletividade</u>	73

3.1.4	<u>Avaliação da atividade anti-amastigota da quercetina em macrófagos de hamster tratados antes da infecção</u>	74
3.1.5	<u>Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio intracelular em macrófagos</u>	75
3.2	Atividade <i>in vivo</i> da quercetina no modelo hamster (<i>Mesocricetus auratus</i>)	77
3.2.1	<u>Tratamento após 7 dias de infecção</u>	77
3.2.2	<u>Tratamento após a lesão estabelecida</u>	79
3.3	Atividade da quercetina no modelo de infecção com <i>L. major</i>	81
3.3.1	<u>Atividade em promastigotas</u>	82
3.3.2	<u>Avaliação da toxicidade em macrófagos de camundongos BALB/c</u>	82
3.3.3	<u>Atividade anti-amastigota</u>	83
3.3.3.1	Determinação da IC50.....	83
3.3.4	<u>Avaliação da atividade anti-amastigota da quercetina em macrófagos de camundongos BALB/c tratados por 24 horas antes da infecção</u>	85
3.3.5	<u>Avaliação da produção de citocinas por macrófagos de camundongos BALB/c infectados com <i>L. major</i></u>	86
3.4	Atividade <i>in vivo</i> da quercetina em camundongos BALB/c infectados com <i>L. major</i>	87
3.4.1	<u>Tamanho de lesão e carga parasitária</u>	87
3.4.2	<u>Produção de citocinas por linfócitos de camundongos BALB/ c infectados e tratados com quercetina 40mg/kg</u>	91
3.5	Avaliação da atividade da quercetina em camundongos C57BL/6	93
3.5.1	<u>Avaliação da toxicidade em macrófagos</u>	93
3.5.2	<u>Atividade anti-amastigota e determinação da IC50</u>	94
3.6	Atividade <i>in vivo</i> da quercetina em camundongos C57BL/6 infectados com <i>L. major</i>	96
3.6.1	<u>Tamanho da lesão e carga parasitária</u>	96
3.6.2	<u>Produção de citocinas por linfócitos de camundongos C57BL/6 tratados com quercetina 40mg/kg</u>	99
4	DISCUSSÃO	
	CONCLUSÕES	111
	REFERENCIAS	112

INTRODUÇÃO

LEISHMANIOSES

Aspectos gerais e epidemiologia

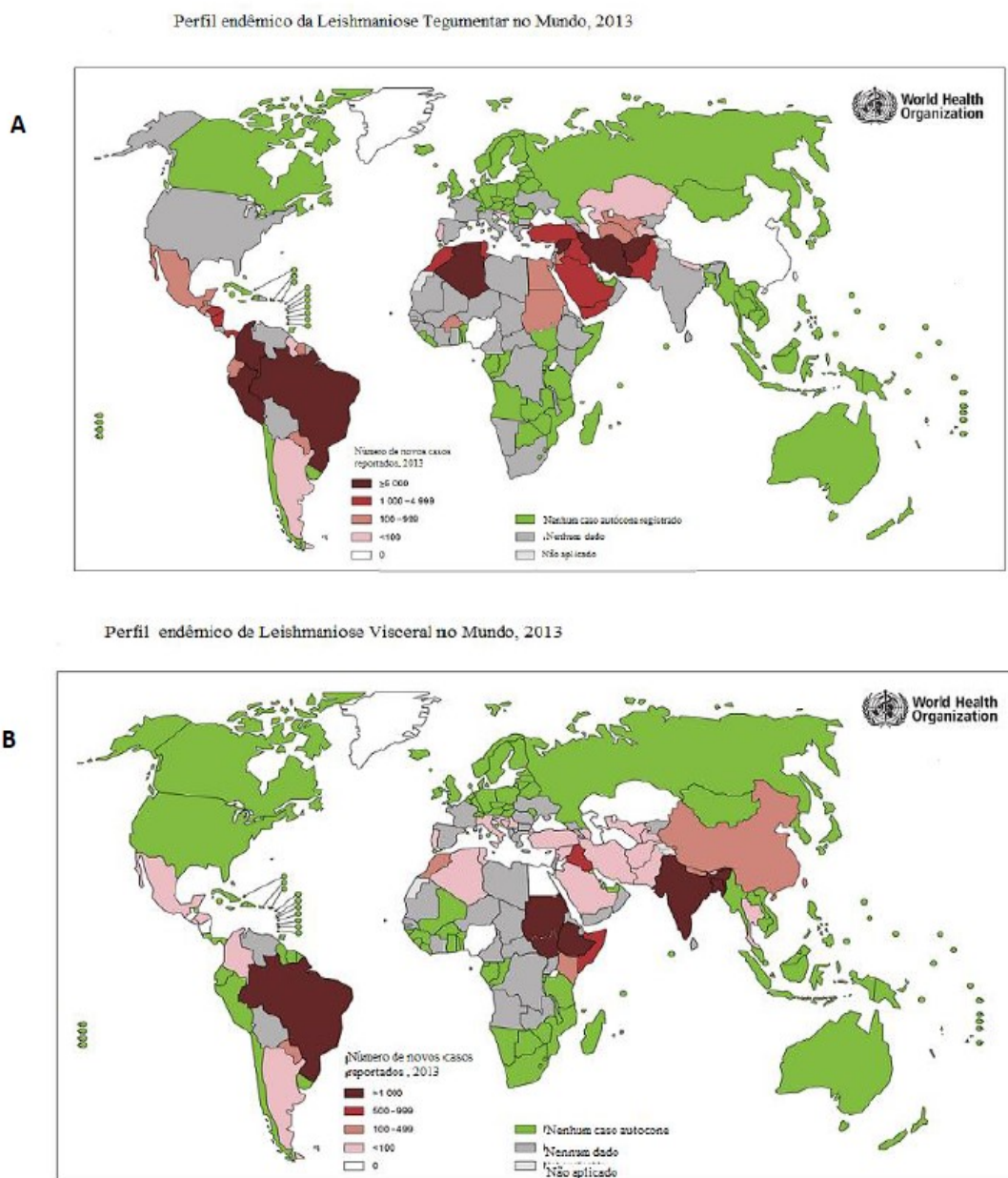
As Leishmanioses são causadas por aproximadamente 20 espécies do gênero *Leishmania* e resultam uma variação de formas clínicas de acordo com características específicas do parasito e da resposta imune do hospedeiro. As formas clínicas da doença dividem-se em tegumentares e visceral (BERMAN, 1997). O parasito é transmitido aos hospedeiros vertebrados, que incluem uma grande variedade de mamíferos como roedores, canídeos e humanos, por insetos flebotomíneos infectados (NEVES, 2011).

Dados recentes da literatura mostraram que mais de 98 países e territórios são endêmicos para a leishmaniose, com mais de 12 milhões de pessoas infectadas e 300 milhões de pessoas em risco (OMS, 2016). Estima-se que ocorram 200.000 a 400.000 novos casos anuais da forma visceral da doença e mais de 90% de novos casos ocorrem em 6 países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão (ALVAR et al., 2012; OMS, 2016). A leishmaniose tegumentar é mais distribuída pelo mundo, cerca de 70 a 75% concentrada em 10 países: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã e República árabe da Síria, Etiópia, Sudão do Norte, Costa Rica e Peru (ALVAR et al., 2012, OMS 2016). Entre 0.7 milhões e 1.3 milhões de novos casos são registrados globalmente todo ano (OMS, 2016). A Figura 1 mostra a distribuição da leishmaniose pelo mundo. O Brasil é endêmico para as duas formas da doença. Na década de 80, a leishmaniose tegumentar americana foi registrada em 19 unidades federativas, quando em 2003, foi confirmada a autoctonia em todos os estados brasileiros. No período de 2006 a 2015 foram registrados mais de 191 mil casos, sendo 89.327 na Região Norte, 65.625 na Nordeste, 31.896 na Centro-Oeste, 18.333 na Sudeste e 4.082 na Sul (Tabela 1) (PORTAL DA SAÚDE, 2015). O meio ambiente e movimentos da população permitem alterações na densidade dos vetores e reservatórios e conseqüentemente pode aumentar a exposição humana a insetos infectados. Portanto, o aumento da incidência e prevalência da doença é atribuído a vários fatores como migração populacional, devastação do ambiente silvestre, urbanização e imunossupressão (ORYAN; AKBARI, 2016).

A Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) é uma doença que apresenta elevada frequência no Brasil. Era considerada uma doença de trabalhadores de áreas rurais, entretanto, a epidemiologia mudou consideravelmente no decorrer das últimas décadas. O vetor tornou-se adaptado a áreas peri-domiciliares em regiões rurais o que levou a um

crecente número de mulheres e crianças infectadas nas últimas décadas (MURBACK et al., 2011;ORYAN & AKBARI, 2016).

Figura 1. Perfil endêmico das Leishmanioses no Mundo, 2013



Legen

da : Perfil endêmico das leishmanioses no mundo. (A) Perfil endêmico da leishmaniose tegumentar (B) Perfil endêmico da leishmaniose visceral
 Fonte: . Adaptado de OMS, 2015.

Tabela 1. Casos de LTA no Brasil. 2006 a 2015. Incidência anual.

Região e UF	2006	2007	2008	2009	2010	2011	2012	2013	2014	2015
Região Norte	8.833	9.890	8.680	8.272	7.108	8.615	10.196	8.407	10.387	8.939
Rondônia	1.204	971	941	1.035	922	697	1.136	1.203	1.148	1.044
Acre	1.124	913	972	906	1.026	878	1.134	923	1.030	1.058
Amazonas	1.554	2.219	1.778	1.439	1.130	2.282	2.246	1.429	1.801	1.645
Roraima	285	340	350	441	641	222	444	524	463	467
Pará	3.554	4.305	3.623	3.347	2.331	3.595	4.076	3.058	4.356	3.610
Amapá	595	667	629	513	462	534	693	761	958	525
Tocantins	517	475	387	591	596	407	467	509	631	590
Região Nordeste	6.169	5.925	6.003	6.910	8.911	7.952	8.279	5.355	4.969	5.152
Maranhão	2.174	2.335	1.661	1.624	2.455	2.746	2.517	1.732	2.105	1.684
Piauí	152	108	73	104	146	173	120	69	85	59
Ceará	1006	935	700	993	1014	806	940	514	525	555
Rio Grande do Norte	7	6	6	56	82	7	6	6	8	3
Paraíba	46	60	53	109	83	26	67	35	28	75
Pernambuco	413	446	388	501	419	431	314	228	198	414
Alagoas	33	111	89	77	32	35	62	51	18	180
Sergipe	6	4	10	11	7	7	9	3	4	7
Bahia	2.332	1.920	3.023	3.435	4.673	3.721	4.244	2.717	1.998	2.175
Região Sudeste	2.868	1.898	1.592	1.605	2.428	2.179	1.388	1.150	1.460	1.762
Minas Gerais	1.855	1.322	1.123	1.021	1.887	1.745	978	781	1.033	1.230
Espírito Santo	241	109	76	100	124	122	107	73	89	107
Rio de Janeiro	283	119	55	92	86	65	41	25	19	23
São Paulo	489	348	338	392	331	247	262	271	319	402
Região Sul	573	514	630	464	253	317	439	296	373	493
Paraná	409	438	533	409	228	309	419	273	350	478
Santa Catarina	158	67	87	45	21	7	13	14	15	11
Rio Grande do Sul	6	9	10	10	4	1	7	9	8	4
Região Centro-Oeste	3.852	3.095	3.005	4.492	3.163	2.274	3.118	2.922	3.038	2.937
Mato Grosso do Sul	116	99	118	105	89	93	135	128	141	121
Mato Grosso	3.181	2.715	2.521	3.900	2.466	1.832	2.639	2.419	2.326	2.281
Goiás	505	246	351	460	553	314	310	355	535	490
Distrito Federal	50	35	15	27	55	35	34	20	36	45
UF ignorada	102	85	82	81	118	58	127	96	69	112
Brasil	22.397	21.407	19.992	21.824	21.981	21.395	23.547	18.226	20.296	19.395

Fonte: PORTAL SAÚDE. <http://portalsaude.saude.gov.br>

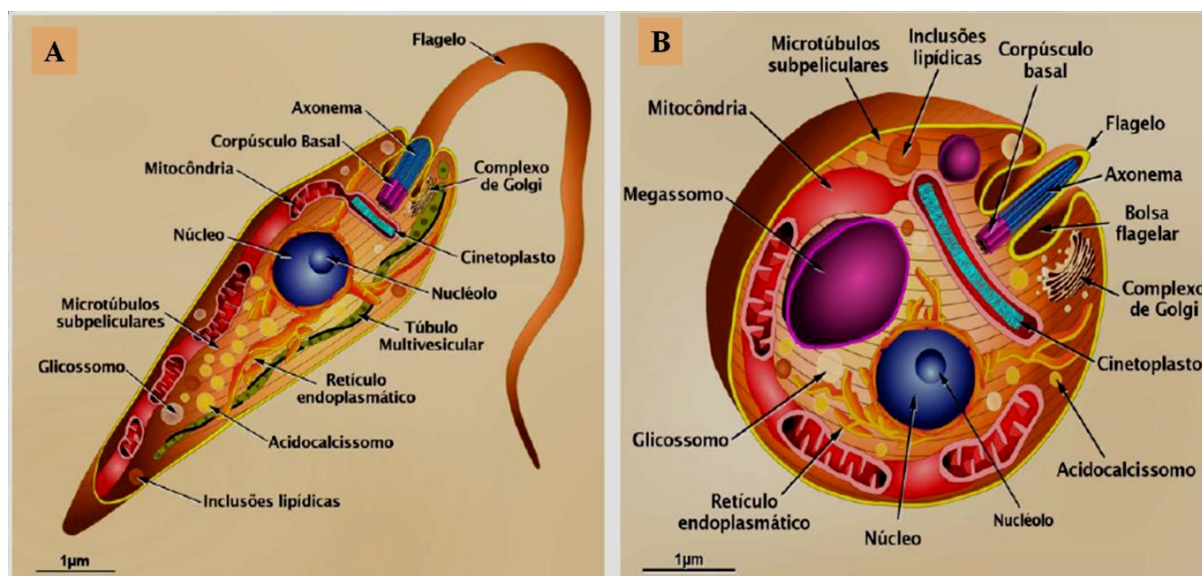
Agente etiológico

Os protozoários do gênero *Leishmania* pertencem à ordem kinetoplastida e à família Trypanosomatidae. Essa família é constituída por parasitos que possuem um ou dois flagelos, ligados ou não à membrana plasmática e uma única mitocôndria percorrendo toda a extensão da célula. Na mitocôndria encontra-se uma estrutura característica desta ordem, denominada cinetoplasto, formado por DNA mitocondrial. Além destas características, parasitos desta família apresentam: bolsa flagelar, onde ocorre o tráfego de entrada e saída de moléculas; microtúbulos de sustentação que conferem rigidez à membrana celular; glicossomo, uma organela que apresenta a função de isolar enzimas glicolíticas; omegassomo, uma estrutura capaz de digerir moléculas ingeridas pelo parasito por

endocitose. A reprodução destes protozoários é assexuada por fissão binária (VICKERMAN, 1994; STUART et al., 2008).

A *Leishmaniaspp* apresenta duas formas evolutivas ao longo do seu ciclo biológico: promastigota e amastigota. As promastigotas (Figura 2A) são alongadas e apresentam flagelo livre, com dimensões entre 14 e 20 μm de comprimento, possuindo núcleo central e cinetoplasto próximo a extremidade anterior, são encontradas no tubo digestivo dos insetos flebotomíneos e multiplicam-se por divisão binária longitudinal. As amastigotas (Figura 2B) são células ovais com diâmetro de 1,5 a 3,0X 3,0a 6,5 μm , apresentando núcleo grande e arredondado e o flagelo internalizado. Esta forma evolutiva multiplica-se por divisão binária no interior de células do sistema fagocítico mononuclear dos hospedeiros vertebrados (CUNNINGHAM, 2002; TEIXEIRA et al., 2013).

Figura 2. Esquema das formas evolutivas de *Leishmaniaspp*

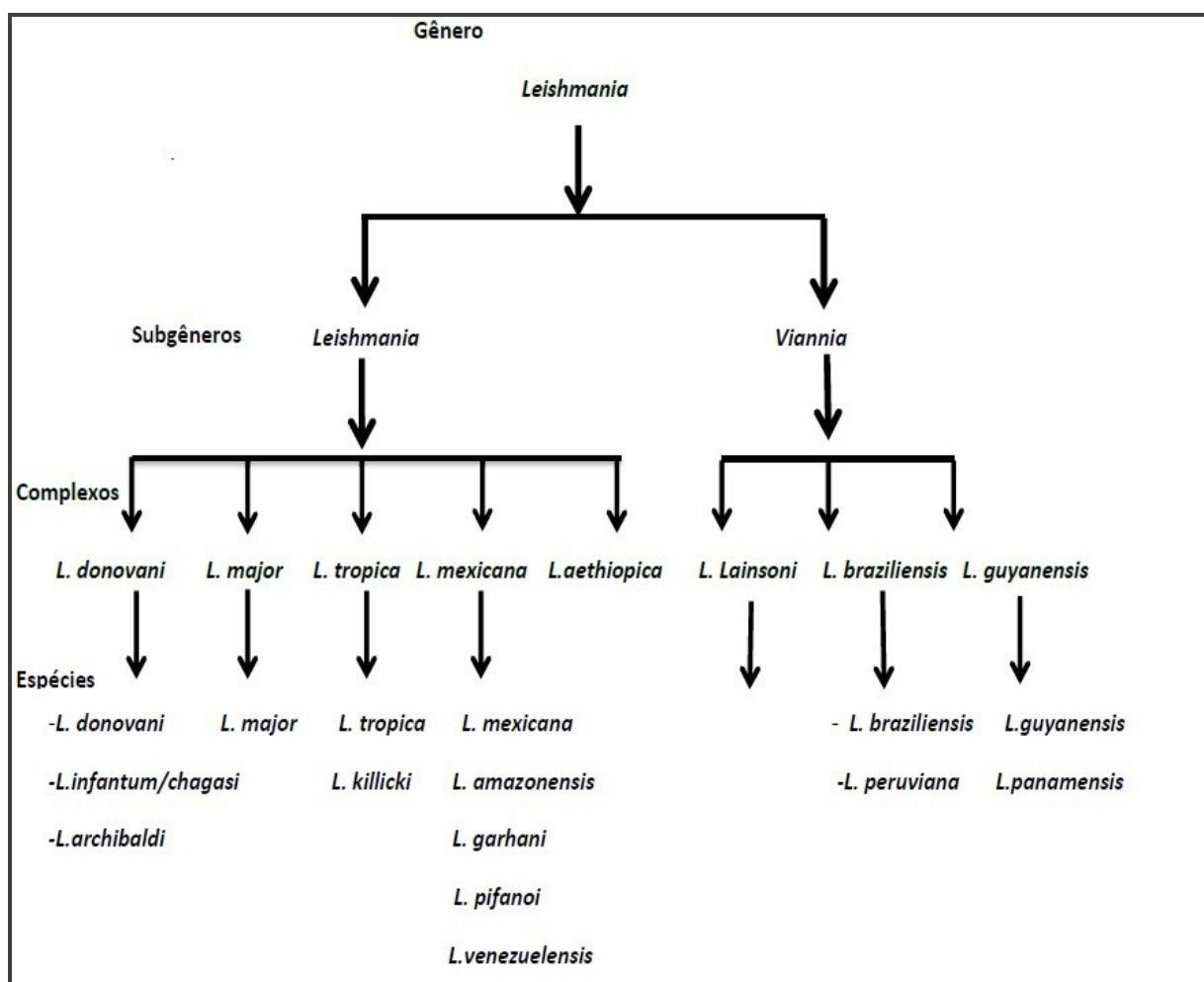


Legenda: Forma Promastigota com formato alongado e flagelo livre. (B) Forma Amastigota com formato arredondado e flagelo internalizado. Ilustração mostrando os componentes das células
Fonte: Adaptado de Teixeira et al 2013.

O gênero *Leishmania* pode se subdividir em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania* (Figura 3). Esta subdivisão está relacionada ao desenvolvimento dos promastigotas no inseto vetor. No subgênero *Viannia*, os promastigotas migram da região posterior para as regiões média e anterior do intestino, no subgênero *Leishmania*, os parasitos colonizam as regiões média e anterior do intestino do invertebrado (NEVES, 2002; NEVES

2011). Fazem parte do subgênero *Viannia* as espécies do complexo *L. braziliensis*, que são responsáveis pela leishmaniose cutânea e mucosa. O subgênero *Leishmania* é composto pelos complexos *Leishmania major* com espécies responsáveis pela leishmaniose cutânea em países do velho mundo; pelo complexo *Leishmania mexicana*, responsável pela leishmaniose cutânea e por formas raras como a leishmaniose cutânea difusa, e pelo complexo *Leishmania donovani* responsável pela leishmaniose visceral. No Velho e no Novo Mundo, existem mais de 30 espécies de leishmanias nomeadas e mais de 20 espécies apresentam importância clínica. No Brasil, as espécies mais encontradas são: *Leishmania braziliensis*, *Leishmania amazonensis* e *L. guyanensis* (OMS, 2010).

Figura 3. Classificação das espécies de *Leishmania* de acordo com os subgêneros.



Legenda: Gênero, subgêneros, complexos e espécies de *Leishmania*.

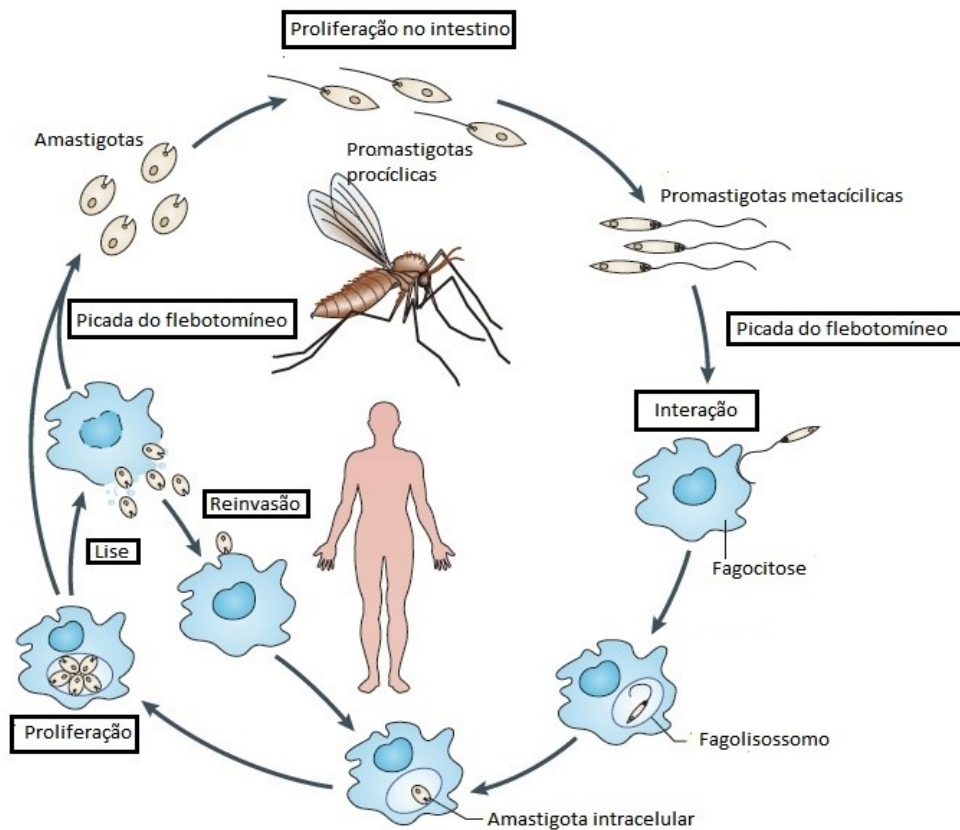
Fonte: Adaptado de World health organization. (WHO, 2010).

Ciclo biológico e interação parasito- hospedeiro

Os vetores de *Leishmaniaspp* são insetosfêmeas da ordem díptera, família psychodidae, gênero *Lutzomya*, no Novo Mundo e *Phlebotomus* no Velho Mundo. Ao realizarem seu repasto sanguíneo, os insetos infectados regurgitam formas promastigotas metacíclicas na pele do hospedeiro, que são internalizadas pelas células teciduais fagocíticas (REY, 2010) (Figura 4)A saliva do flebotomíneo, que é inoculada juntamente com o parasito na pele, contribui para o estabelecimento da infecção. Entre as substâncias que compõem a saliva, um peptídeo denominado maxadilan, favorece a sobrevivência do parasito recém inoculado, desempenhando um papel imunomodulador da resposta imune, apresentando um efeito sobre as células apresentadoras de antígeno (APCs), como: inibição da produção de fator de necrose tumoral (TNF) por macrófagos, diminuição da capacidade de produzir óxido nítrico (NO), indução de uma resposta anti-inflamatória que contribui para a sobrevivência do parasito (WHEAT et al., 2008; DUTRA et al.,2010).

No hospedeiro vertebrado, as promastigotas são fagocitadas por macrófagos e células dendríticas da derme. Este processo é mediado por interaçõesentre moléculas de superfície do parasito e porreceptores na célula hospedeira, que reconhecem sequências de aminoácidos específicas. Asproteínas de superfície da *Leishmania*, além de auxiliar e facilitar a internalização,também pode caracterizar um fator de virulência nas espécies, além de desativar omecanismo microbicida dos macrófagos permitindo a sobrevivência do parasito dentrodo ambiente hostil do fagolisossomo (VAN ASSCHE et al., 2011; ISNARD; SHIO; OLIVIER, 2012; BARTHOLOMEU et al., 2014).

Dentro dos fagolisossomos, as promastigotas metacíclicas se diferenciam emamastigotas,um processo dura em média de 12 a 24 horas e após este tempo, começam a se multiplicar por divisão binária (VAN ASSCHEet al, 2011) até que a célula se rompa, liberando as amastigotas que infectarão outros fagócitos, podendo causar lesões cutâneas (espécies cutâneas) ou acometer órgãos internos (espécies viscerotrópicas).O ciclo se completa quando um flebotomíneo, ao picar um indivíduo ou um animalparasitado, ingere macrófagos e monócitos infectados com amastigotas(Figura 4). As mudanças nas condições, ao mudar-se de um hospedeiro mamífero parao intestino do vetor (tais como a diminuição da temperatura e aumento do pH), requeruma adaptação do parasito, desta forma, as amastigotas se diferenciam empromastigotas que se multiplicam e passam por um processo denominadometaciclogênese que é caracterizado pela transformação de promastigotaspró-ciclicas em promastigotas metacíclicas(NEUBER, 2008; VAN ASSCHE et al., 2011)

Figura 4. Ciclo de vida de *Leishmania*

Legenda – Promastigotas pró-cíclicas de *Leishmania* se diferenciam em promastigotas metacíclicas, forma infectante, dentro do tubo digestório do flebotomíneo. Durante o repasto sanguíneo, o flebotomíneo regurgita a forma infectante juntamente com imunomoduladores e vários componentes salivares. As promastigotas metacíclicas são então fagocitadas, se transformam em amastigotas que se replicam dentro da célula hospedeira, que se rompem quando muitas amastigotas estão presentes, permitindo a reinfeção dos fagócitos locais. O ciclo de transmissão é concluído, quando fagócitos infectados são ingeridos por outro flebotomíneo durante um novo repasto sanguíneo e as amastigotas em seguida, se transformam em promastigotas no intestino médio do flebotomíneo.

Fonte: Adaptado de Kaye & Scott, 2011.

O primeiro passo para a interação da *Leishmania* com a célula hospedeira é a ligação entre as moléculas de superfície de ambos. O parasito possui uma série de moléculas de superfície e moléculas secretadas no momento da entrada na célula. Muitas destas moléculas estão envolvidas em “disparar” vias de sinalização específicas para a entrada e sobrevivência intracelular (MORAIS et al., 2015). Embora os macrófagos sejam as principais células hospedeiras, a *Leishmania* infecta também monócitos, células dendríticas, neutrófilos e fibroblastos (DE TREZ et al., 2009; KAYE; SCOTT, 2011).

Nas fases iniciais da infecção, em resposta a picada do flebotomíneo, ocorre liberação de alarminas, que são sinalizadoras de dano tecidual, citocinas e quimiocinas (BIANCHI, 2007; KAYE; SCOTT, 2011) e então ocorre o recrutamento de neutrófilos, que produzem espécies reativas de oxigênio, elastase de neutrófilos e redes de neutrófilos extracelular (NETS) (GUIMARÃES-COSTA et al., 2009; LIU et al., 2015). No entanto, o parasito pode evadir a estes mecanismos e neutrófilos podem servir de células hospedeiras para *Leishmania* por até 18 horas, quando sofrem apoptose e poderão ser fagocitados por macrófagos. Por esse mecanismo, o neutrófilo funciona como “cavalo de Tróia”, e o parasito entra de forma silenciosa na célula, não disparando mecanismos microbicidas pró-inflamatórios, favorecendo o sucesso da infecção (PETERS et al., 2008; HURRELL; REGLI; TACCHINI-COTTIER, 2016).

Outros mecanismos de internalização silenciosa do parasito no macrófago são mediados por receptores e envolvem moléculas de superfície da *Leishmania*. As principais estruturas envolvidas neste processo são: metaloprotease de superfície de promastigotas (gp63), lipofosfoliglicano (LPG), e GILP's (glicosil-inositol fosfolípidos) de *Leishmania* e também receptores da célula hospedeira, como receptores do sistema complemento (CR1 e CR3) e receptores de manose. A entrada do parasito através destes receptores não ativa o mecanismo microbicida da célula hospedeira (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999; MORAIS et al., 2015).

O LPG de *Leishmania* está envolvido no processo de invasão de promastigotas e amastigotas em *Leishmania major* em macrófagos. Entretanto, algumas espécies de *Leishmania* não possuem ou possuem pouca LPG na superfície das amastigotas (VANNIER-SANTOS; MARTINY; DE SOUZA, 2002). Após o contato com a célula hospedeira, o LPG é transferido do parasito para a membrana do macrófago, e parece promover o bloqueio da sua ativação, inibindo a atividade da enzima proteína cinase C (PKC). Desse modo, não ocorre a explosão oxidativa do macrófago, beneficiando a *Leishmania* (VIEIRA; SACERDOTI-SIERRA; JAFFE, 2002). A ligação de promastigotas

de *Leishmania* opsonizada por C3bi ao receptor CR3 do macrófago leva a ativação de uma proteína tirosina fosfatase (SHP1) que promove a desfosforilação de STAT-1, interferindo na via de sinalização que resulta na transcrição do gene IL-12p40, inibindo, assim, a produção desta citocina pelo macrófago e conseqüentemente os mecanismos microbicidas (DUTRA, 2010; MORAIS et al., 2015).

O LPG e gp63 possuem funções que se complementam. O LPG promove a sobrevivência dos promastigotas pela inibição da fusão do fagossomo com o lisossomo. No entanto, se o fagolisossomo se formar, gp63 age impedindo a ação de enzimas lisossomais do macrófago (DUTRA, 2010; SHIO et al., 2015). A gp63 também é responsável pela ativação de proteínas tirosinas fosfatases, permitindo alterações nas vias de sinalização e impedindo a ativação clássica do macrófago por Interferon- γ (IFN- γ) e conseqüentemente inibindo a produção de Interleucina-12 (IL-12), (TNF) e óxido nítrico (NO) pelos macrófagos. Além disso, a expressão e atividade de gp63 é um fator para a redução da secreção da citocina Interleucina-1 β (IL-1 β) e conseqüentemente essa redução é acompanhada de inibição da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), devido ao impedimento da fosforilação de PKC, responsável pela explosão oxidativa do macrófago (SHIO et al., 2015).

A *Leishmania* suprime a atividade microbicida, produção de NO e ROS, apresentação de antígenos e modula a produção de citocinas nos macrófagos (GREGORY; OLIVIER, 2005). A infecção por *Leishmania major* em macrófagos peritoneais murinos permite a supressão da resposta inflamatória induzida por Lipopolissacarídeo (LPS), como a produção de IL-12, IL-17 e IL-6 e é capaz de aumentar a produção de citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , TNF, MIP1 α e MCP-1, além da citocina anti-inflamatória IL-10. Nesse sentido, *Leishmania* possui seletividade para “manipular” certas citocinas para estimular um estado de ativação que permita sua sobrevivência (FILARDY et al., 2014; PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015). A inibição da produção de IL-12 e TNF pelos macrófagos pode contribuir para o chamado estado alternativo de ativação do macrófago (M2). A IL-12 e o TNF são citocinas importantes para estimular a resposta imune celular e conseqüentemente promover a resposta do tipo 1 pró-inflamatória e ativar o macrófago (VIGNALI; KUCHROO, 2008; MA et al., 2015).

Muitas moléculas de *Leishmania* contribuem para a adequação e a sobrevivência desses parasitos dentro dos macrófagos (Tabela 2). As proteínas ortólogas de mamíferos, como proibitina e enzima Proteína cinase ortóloga (PKC-Like) tem uma importante papel na captura do parasito. A proibitina interage com proteína do choque térmico de 70

kilodaltons(HSP70) do hospedeiro presente na superfície do macrófago e faz parte do complexo de reconhecimento que é necessário para a ligação com os macrófagos. A supreeexpressão dessas proteínas aumenta a infectividade de promastigotas metacíclicas de *L. donovani* em macrófagos de linhagem J774.1(JAIN et al., 2010).A enzima PKC-like (proteína cinase C ortóloga)em *L. mexicana* é expressa durante a fase estacionária da *Leishmania* e possui uma atividade dependente de cálcio e fosfatidilserina em macrófagos peritoneais residentes murinos,tendo um importante papel na internalização do parasito(ALVAREZ-RUEDA; BIRON; LE PAPE, 2009).

Foi relatado em *L. major* que a produção da enzima mitocondrial inositol fosfosfingolípido fosfolipase C-Like(ISCL) é responsável pela degradação de esfingolípídeos. Mutantes desta enzima tiveram uma menor taxa de sobrevivência em macrófagos, indicando que ISCL é necessário para a sobrevivência intracelular do parasito no macrófago (ZHANG et al., 2012).A aldolase, presente em *L. donovani*, por exemplo, liga e ativa SHP-1 de macrófagos e pode impedir a acidificação e permitir a sobrevivência no ambiente hostil no fagolisossomo(NANDAN et al., 2007). Em *Leishmania major*, a metionina sulfóxido redutase A (MsrA) é necessária para a resistência ao stress oxidativo, os parasitos mutantes nesta enzima exibem alta sensibilidade ao peróxido de hidrogênio (H₂O₂) e uma baixa capacidade de replicação destes parasitos(SANSOM et al., 2013)..

A *L. donovani* possui a enzima Arabino 1,4 lactona oxidase (ALO), envolvida na biossíntese da vitamina C. As promastigotas deficientes desta enzima induzem a produção de IFN- γ e TNF e são suscetíveis a ROS e RNI em macrófagos de linhagem J774A.1. Em camundongos BALB/c promovem imunidade protetora contra *Leishmania donovani*(ANAND; MADHUBALA, 2015). A triparedoxina peroxidase (TXNPx) é secretada por algumas espécies de *Leishmania* e age como antioxidante e detoxifica peróxidos, ROS e Radicais Intermediários de Nitrogênio (RNI) foi relatada em *L. piffanoi*(KIMA et al., 2010), *L. amazonensis* (HENARD et al., 2014), *L. donovani*(SUMAN et al., 2016). Outra enzima sequestradora de ROS, a Tioredoxina, é induzida durante a infecção e é envolvida na estabilização de proteínas tirosinas fosfatases (PODINOVSKAIA; DESCOTEAUX, 2015). A habilidade da *Leishmania* alterar a sinalização do macrófago e conter a inflamação é mediada pela cisteína protease B (CBP) a qual foi relatada em *L. braziliensis*(GOMES et al., 2017). Foi identificado em *Leishmania major*, genes ortólogos da citocina MIF (fator inibitório de migração de macrófagos) que se liga ao receptor de MIF nos macrófagos e que possivelmente suprime

o desenvolvimento de uma resposta protetora, manipulando a resposta do hospedeiro, aumentando a exaustão e depleção de células T protetoras, facilitando assim sua sobrevivência (HOLOWKA et al., 2016).

Tabela 2. Fatores de sobrevivência intracelular de *Leishmania* e seu papel na interação *Leishmania*- macrófago

Nome	Descrição	Papel na interação-parasito hospedeiro	Referência
LPG	Lipofosfoglicano	↓ PKC; explosão oxidativa	VIEIRA et al., 2002
GP63	Metaloprotease dependente de zinco	Ativa proteína tirosina fosfatase ↓ IL-12, TNF, NO	SHIO et al., 2015
Proibitina	Proibitina ortóloga	Interage com HSP70 do hospedeiro ↑ Captura do parasito	JAIN et al., 2010
PKC- Like	Proteína Cinase C ortóloga	↑ Fagocitose do parasito	ALVAREZ- RUEDA; BIRON; LE PAPE, 2009
ISCL	Inositol fosfofingolípídeo fosfolipase c-like	↑ Sobrevivencia e replicação	ZHANG et al., 2012
ALDOLASE	Aldolase frutose-bifosfato	↓ Ativa SHP-1 acidificação	NANDAN et al., 2007
MsrA	Metionina sulfose redutase A	↑ Resistencia a ROS, RNI	SAMSON et al., 2013
ALO	Arabino 1,4 lactona oxidase	↓ Resistencia a ROS IL-12, TNF	ANAND; MADHUBALA, 2015
TxNPx	Triparedoxina redutase	Detoxifica ROS, RNI	SUMAN et al., 2016
Tioredoxina	Enzima antioxidante	↓ ROS Estabiliza SHP	PODINOVSKAIA & DESCOTEAUX, 2015
CPB	Cisteína protease B	↓ Ativação NO	GOMES et al., 2017
MIF	Fator inibitório de migração de macrófagos	↓ Resposta protetora	HOLOWKA et al., 2016

Fonte: Adaptado de PODINOVSKAIA & DESCOTEAUX, 2015

As estratégias de evasão dos mecanismos de defesa e sobrevivência intracelular de *Leishmania*, permitem o sucesso da infecção e conseqüentemente influenciam a caracterização das diferentes formas clínicas da leishmaniose.

Formas clínicas e aspectos da resposta imune na leishmaniose

Dependendo de fatores como a espécie infectante e a resposta imune do hospedeiro, a leishmaniose pode cursar diversas manifestações clínicas, como a visceral, que é conhecida como Calazar (a forma mais grave da doença) e as formas tegumentares que se classificam em: cutâneo-localizada, difusa, disseminada e mucosa. A tabela 3 mostra a apresentação clínica, sintomas, espécies e distribuição regional das diversas formas da leishmaniose.

A leishmaniose visceral (Figura 5A) é causada por espécies viscerotrópicas, com acentuado tropismo do parasito pelo sistema fagocítico mononuclear do fígado, baço, medula óssea e tecidos linfóides. Os principais sintomas são constituídos de febre, perda de peso, hepatoesplenomegalia, hipergamaglobulinemia, podendo ser fatal se não for tratada em 95% dos casos (MCGWIRE; SATOSKAR, 2014). A leishmaniose visceral apresenta um desbalanço na resposta imune, com um perfil misto de citocinas, com produção de IL-10, IL-6, IFN- γ e TGF- β (GOLLOB; VIANA; DUTRA, 2014).

A forma cutânea localizada (Figura 5B) caracteriza-se por lesão, que, na maioria das vezes, ocorre no local da picada do flebótomo, sendo o seu aspecto mais frequente na forma de úlcera com bordas elevadas que pode ser única ou múltipla. A resposta imune específica nesta forma clínica da doença é intensa com linfoproliferação e produção de citocinas tipo I, (IFN- γ , IL-2 e TNF) (MENDONÇA et al., 1986; PIRMEZ et al., 1993; DA-CRUZ et al., 1996; CASTES; TAPIA, 1998), porém a resposta reguladora de citocinas do tipo II também está envolvida pela produção de IL-4, IL-5, IL-10, IL-13 e TGF- β (BARRAL; BARRAL NETO, 1994; SALHI et al., 2008), sendo assim, esta forma da doença mostra um equilíbrio entre as respostas do tipo 1 (Th1) e 2 (Th2). Pacientes com leishmaniose cutânea que evoluem para a cura, apresentam uma resposta específica de células T aos antígenos de *Leishmania* com uma grande produção de IFN- γ (CARVALHO et al., 1995), IL-17 e CXCL-11 (MOAFI et al., 2016), no entanto apresentam também mecanismos de regulação como alta produção de IL-10, permitindo um equilíbrio e controle do parasito, sem promover danos teciduais (GOMES-SILVA et al., 2007) e também prevenir o desenvolvimento da forma mucosa da doença (GOMES et al., 2016). As principais espécies envolvidas nesta forma clínica são *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanensis* no Brasil e *L. major* em países do velho mundo.

Tabela 3. Apresentação clínica, sintomas, principais espécies e áreas afetadas pela Leishmaniose

Apresentação Clínica	Sintomas	Espécies	Áreas (Países)
Leishmaniose Visceral	Febre prolongada, esplenomegalia, hepatomegalia, pancitopenia, anemia progressiva e perda de peso.	<i>L. donovani</i> <i>L. infantum</i> <i>L. siamensis</i>	Índia, Bangladesh, Nepal, África. Região do Mediterrâneo, América do Sul e Central. Tailândia
Leishmaniose Dérmica Pós Calazar Leishmaniose cutânea (Velho Mundo)	Dermatite grave com lesões cutâneas e placas pelo corpo contendo os parasitos Pápulas eritematosas no sítio da picada do inseto vetor, podendo evoluir para uma forma mais grave.	<i>L. donovani</i> <i>L. aethiopica</i> , <i>L. killicki</i> , <i>L. major</i> , <i>L. tropica</i> , <i>L. turanica</i>	Leste da África, Índia, Bangladesh, Nepal. Sul da Europa, Oriente Médio, Sudeste da Ásia e África
Leishmaniose cutânea (Novo Mundo)	Pápulas eritematosas no sítio da picada do inseto vetor, podendo evoluir para uma forma mais grave	<i>L. amazonensis</i> , <i>L. braziliensis</i> , <i>L. colombienseis</i> , <i>L. guyanensis</i> , <i>L. mexicana</i> , <i>L. panamensis</i> , <i>L. peruviana</i> , <i>L. venezuelensis</i> , <i>L. pifanoi</i>	América Central e do Sul
Leishmaniose Mucosa	Lesões destrutivas e desfigurastes em mucosa do sistema respiratório superior	<i>L. aethiopica</i> , <i>L. braziliensis</i> , <i>L. guyanensis</i> , <i>L. panamensis</i>	Etiópia, América Central e do Sul.

Fonte: Adaptado de NAGLE et al., 2014.

A leishmaniose cutâneo- difusa (LCD) (Figura 5D) ou anérgica difere-se de outras formas clínicas da leishmaniose tegumentar americana por apresentar lesões não ulceradas, repletas de parasitos e apresentar fraca ou ausente resposta celular do tipo 1. A ausência dessa resposta impede o controle da multiplicação do parasito, facilitando a disseminação das amastigotas pelo tegumento. No Brasil essa forma da doença é causada principalmente pela espécie *L. amazonensis*. Pacientes com LCD não respondem ao teste de hipersensibilidade aos antígenos do parasito. Observa-se a ausência da produção de IFN- γ por células mononucleares do sangue periférico, em contraste um aumento da expressão da IL-10 (PIRMEZ et al., 1993; GUIMARÃES et al., 2005), e elevada expressão de mediadores antiinflamatórios como TGF- β e arginase I e níveis reduzidos de TNF- α e IL-12 (FRANÇA-COSTA et al., 2015). As lesões se apresentam como pápulas, eritemas, nódulos, infiltrações e aspecto tumoral. O LPG de *Leishmania* possui afinidade com o receptor *toll like 2* (TLR) 2 e ativa as células *Natural killers* (NK) humanas (BECKER et al., 2003). As células NK tem um papel importante na patogênese desta forma da doença, já que, pacientes com a forma cutâneo-difusa, mostraram uma redução do número

dessascélulas, em relação aos pacientes com a forma localizada e também uma produção diminuída de IFN- γ e TNF- α , associadas com a uma baixa expressão de receptores TLR2, TLR1 e TLR6. Além disso, nas lesões desses pacientes pode-se observar uma diminuição da produção destas citocinas, aliada a baixa expressão de receptores que pode estar relacionado com a severidade da doença (CAÑEDA-GUZMÁN et al., 2014).

A leishmaniose disseminada ou cutânea disseminada (Figura 5E) é caracterizada por múltiplas lesões papulares, acometendo várias partes do corpo do indivíduo, com frequência na face e no tronco. Geralmente inicia-se com uma ou várias lesões localizadas, que apresentam características clássicas de úlcera de fundo granuloso e borda elevada, e posteriormente ao aparecimento destas lesões ocorre o aparecimento de lesões distante da picada, possivelmente pela disseminação do parasito pela via hemática (BARRAL; 2011). Esta forma da infecção está frequentemente associada as espécies *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e *L. panamensis*. Pacientes com leishmaniose disseminada apresentam, em sua maioria, teste de hipersensibilidade ao antígeno positivo, embora tenha sido relatado células mononucleares do sangue periférico com baixa resposta linfoproliferativa (CARVALHO et al., 1994). Além disso, há pouca produção de IFN- γ e TNF e altos níveis de IL-10 comparando com pacientes com leishmaniose cutânea (TURETZ et al., 2002; GUIMARÃES et al., 2005).

A diminuição de citocinas do tipo 1 nas células do sangue periférico pode estar relacionado a migração de células reativas para o sítio da lesão, diminuindo a resposta do tipo I nas células do sangue periférico. O fator idade também modifica a resposta imunológica e apresentação clínica da leishmaniose tegumentar. Um estudo mostrou que células mononucleares do sangue periférico de pacientes idosos produziam TNF de forma similar a pacientes jovens, no entanto, a produção de IFN- γ era menor e a produção de IL-10 maior, sugerindo que essa diminuição de IFN- γ e o aumento da IL-10 observada em pacientes idosos podem contribuir para a persistência do parasito e a disseminação por *L. braziliensis* (CARVALHO et al., 2015).

A forma mucosa da doença é considerada uma das formas mais graves, afetando a mucosa das vias aéreas superiores, podendo evoluir para destruição das cavidades oral e nasal (Figura 5C). Com frequência, a forma mucosa é precedida a lesões cutâneas (GOTO; LINDOSO, 2010). A lesão mucosa tardia ou forma mucosa metastática é característica da infecção por espécies do subgênero *Viannia*, principalmente *L. braziliensis*, mas também por *L. guyanensis* e *L. panamensis* (NAIFF; TALHARI; BARRET, 1988; OSORIO;

CASTILLO; OCHOA, 1998; AMATO et al., 2008;). O surgimento deste tipo de lesão é em geral, alguns anos após a lesão cutânea. No entanto, estudos recentes tem mostrado que as lesões podem surgir concomitantemente (COSTA et al., 2014).

Os pacientes com leishmaniose mucosa exibem uma resposta exacerbada ao teste de hipersensibilidade ao antígeno. Essa hipersensibilidade aos antígenos de *Leishmania* também pode ser verificada em ensaios de linfoproliferação *in vitro*. Com a produção aumentada de IFN- γ e TNF, associada a baixos níveis de IL-10 (DA-CRUZ et al., 1996;(BACELLAR et al., 2002; NONATO et al., 2014). Aparentemente ocorre uma resposta inflamatória intensa, sem que ocorra uma regulação adequada, gerando destruição tecidual. A citocina IL- 10 pode modular a expressão de TNF em células de pacientes com leishmaniose cutânea, controlando o processo inflamatório.Os pacientes com a forma mucosa da doença, apresentam baixos níveis de IL-10, com uma produção de citocinas pró-inflamatórias elevada, contribuindo para o processo inflamatório e suprimindo a produção desta citocina (SCHRIEFER et al., 2002). Além disso, a citocina IL- 17 é produzida por células mononuclearesdo sangue periférico de pacientes com leishmaniose mucosa e está presente nas lesões desses pacientes,o que contribui para a inflamação, pois induz o recrutamento de neutrófilos e aumento de mediadores inflamatórios como IL-1, IL-6 e TNF(BOAVENTURA et al., 2010;MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016).

Nos últimos anos, estudos experimentais relacionaram a presença do vírus RNA 1 de *Leishmania* (LRV1) presente nosubgênero *Viannia*com a severidade das lesões mucosas. Este vírus é reconhecido pelo receptor TLR3 do hospedeiro, que induz a produção de citocinas e quimiocinas inflamatórias, contribuindo para o agravamento da lesão(HARTLEY et al., 2012; IVES et al., 2012). Um estudo clínico em Rondônia demonstrou, que entre 147 pacientes, 71% possuíam o LRV1 em *Leishmanias* isoladas das lesões mucosas, corroborando a hipótese de associação entre o LRV1 e a ocorrência desta forma da doença(CANTANHÊDE et al., 2015). Do mesmo modo, foi demonstrado uma correlação entre a presença de LRV1 e as características clínicas da severidade da leishmaniose mucosa nasal (ITO et al., 2015). Também foi a relatada a presença do vírus em 74% das amostras isoladas de pacientes infectados com *Leishmania*, na Guiana francesa (GINOUVÈS et al., 2016).

Em uma região endêmica para *L. braziliensis* no Brasil, denominada Corte da Pedra, na Bahia, pacientes com leishmaniose tegumentar apresentaram lesões atípicas, apresentando muitas lesões na cabeça e pescoço e também apresentaram falha ao tratamento

convencional, denominando essa forma da doença como leishmaniose tegumentar atípica (GUIMARÃES et al., 2016).

Figura 5. Apresentações clínicas da Leishmaniose



Legenda-(A) Leishmaniose visceral; (B) Leishmaniose cutânea; (C) Leishmaniose mucosa; (D) Leishmaniose difusa e (E) Leishmaniose disseminada.

Fonte: Adaptado de Machado et al, 2010 e OMS 2016.

Modelos experimentais para leishmaniose tegumentar

Para o estudo da resposta imune, a interação parasito-hospedeiro, a patogênese da doença, assim como avaliação pré-clínica de vacinas e de candidatos a fármacos, é de extrema importância a utilização de modelos experimentais na leishmaniose.

Nos últimos 40 anos, modelos murinos para a leishmaniose tegumentar americana, tem sido extensivamente empregados para melhor compreender os tipos celulares, citocinas envolvidas, cascata de transdução de sinais e mecanismos efetores antileishmania. Esses estudos são essenciais para entender os mecanismos de controle do parasito, assim como a resolução da doença, desenvolvimento de vacinas e novos fármacos (BOGDAN; RÖLLINGHOFF, 1998; MOURA et al., 2005).

A variedade de modelos animais para a leishmaniose reflete a complexidade da relação parasito-hospedeiro. Os modelos *in vivo* se diferem na resposta imunológica e a maneira como a doença se apresenta clinicamente (DUTRA & DA-SILVA, 2017).

Um modelo animal é considerado válido quando segue alguns parâmetros tais como: apresentação da doença e manifestação clínica, patogênese e resposta imunológica. Portanto, para fazer parte de estudos pré-clínicos, o modelo deve representar bem a doença humana (MEARS et al., 2015; LORÍA CERVERAZ & ANDRADE-NARVÁEZ).

Modelo de infecção para *L. major*

O camundongo é o modelo experimental mais estudado, devido a existência de linhagens *inbred*, ou isogênicos, que são geneticamente iguais. Desta forma é possível a experimentação sem muitas variações entre os animais, diferente de outros modelos animais (SZATKIEWICZ et al., 2008). Em contrapartida, dependendo do microorganismo da infecção de interesse, o camundongo pode não ser um bom modelo (DUTRA & DA-SILVA, 2017).

O principal modelo utilizado no estudo da leishmaniose tegumentar é o modelo camundongo infectado com *L. major*. Uma vez que é bem estabelecido os mecanismos de resistência e suscetibilidade à infecção através das cepas de camundongos C57BL/6 e BALB/c (SCOTT et al., 1988; AGUILAR-TORRENTERA; CARLIER, 2005). O fato destas cepas se constituírem de animais *inbred*, facilita os estudos imunológicos e também pode contribuir para a avaliação de fármacos. Nestes modelos de infecção com *L. major*, a suscetibilidade é relacionada ao desenvolvimento de lesões associada a resposta do tipo 2 e a resistência associada a resposta do tipo 1 (SCOTT et al., 1988; LOCKSLEY; SCOTT, 1991) (Figura 6). Os animais resistentes, os camundongos C57BL/6, desenvolvem lesões pequenas e auto-limitadas que se curam espontaneamente em torno de 10-12 semanas. Em contraste, os camundongos suscetíveis BALB/c desenvolvem lesões grandes ulceradas, levando à metástase e eventual morte (NASSERI & MODABBERI, 1979).

A suscetibilidade de camundongos BALB/c leva a um desenvolvimento severo e progressivo das lesões e eventual morte (NASSERI & MODABBERI, 1979; MEARS et al., 2015), respondendo com aumento de citocinas anti-inflamatórias como IL-4, IL-5, IL-10 e TGF- β (MOSMANN et al., 1986; AGUILAR-TORRENTERA; CARLIER, 2005; SACKS & NANCY, 2002). Já o perfil de resistência dos camundongos C57BL/6 está associado com o aumento da resposta Tipo 1, com aumento da produção de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α , que estimula a síntese da enzima óxido nítrico

sintase induzível (iNOS), levando a produção de NO e controle dos parasitos(SCOTT et al., 1988; LIEW; WEI; PROUDFOOT, 1997; OLEKHNOVITH & BOUSSO, 2015).

A suscetibilidade do modelo BALB/c está ligada ao não desenvolvimento de uma resposta Th1. Estudos apontam um papel importante das citocinas IL-4 e IL-13 na suscetibilidade da infecção, pois a IL-4 é capaz de regular negativamente a produção de IL-12. O receptor IL-4R α é um receptor comum nos complexos de sinalização de IL-4 e IL-13 e mostrou ser um importante fator de suscetibilidade durante a infecção(MOHRS et al., 1999; RADWANSKA et al., 2007). Entretanto, esses resultados são controversos, visto que apesar da IL-4 e IL-13 serem importantes, essas citocinas não são as principais mediadoras da suscetibilidade (JONES et al., 1998; BIEDERMANN et al., 2001; RADWANSKA et al., 2007). Além disso, também foi identificada uma insuficiência em responder à citocina IL-12, em função de uma baixa regulação da expressão do receptor para IL-12 (IL-12R β 2) (HONDOWICZ et al., 1997; PARK et al., 2002).

Foi demonstrado também que essa suscetibilidade está atribuída a uma insuficiência de células TCD4 em expressar o receptor para quimiocinas CXCR3, conseqüentemente, não ocorre o recrutamento de outras células produtoras de IFN- γ para o sítio das lesões. Por outro lado a resolução da infecção em camundongos C57BL/6 foi associada a um aumento da proporção de células T expressando CXCR3 nas lesões e linfonodos (BARBI; BROMBACHER; SATOSKAR, 2008). No entanto, um estudo que utilizou camundongos BALB/c transgênicos superexpressando o receptor CXCR3, demonstrou que a expressão desse receptor exacerba o curso da infecção por *L. major* e que a expressão transgênica de CXCR3 em células T, resultou em um aumento de neutrófilos nos linfonodos drenantes após a infecção por *L. major*. Além disso, o aumento no recrutamento de monócitos inflamatórios, e uma alta produção de IL-10 pelas células do linfonodo é fator que inibe a maturação de macrófagos, contribuindo conseqüentemente para a suscetibilidade, visto que monócitos possuem menor capacidade leishmanicida (OGHUMU et al., 2015).

Foi demonstrado também que em camundongos BALB/c, os linfócitos B com fenótipo regulatório (CD1d⁺ CD5⁺) também estão envolvidos na polarização da resposta Th₂ e conseqüente suscetibilidade à infecção por *L. major*(RONET et al., 2008; RONET et al., 2010).

O modelo de resistência a *Leishmania major*, C57BL/6, desenvolve lesões que se curam espontaneamente e isso está associado com o desenvolvimento de uma resposta Th1, com aumento de citocinas pró-inflamatórias, como relatado anteriormente. Consistente com esses conceitos, sabe-se que a ablação genética de citocinas tipo 1 (IL-12, IFN γ - e TNF),

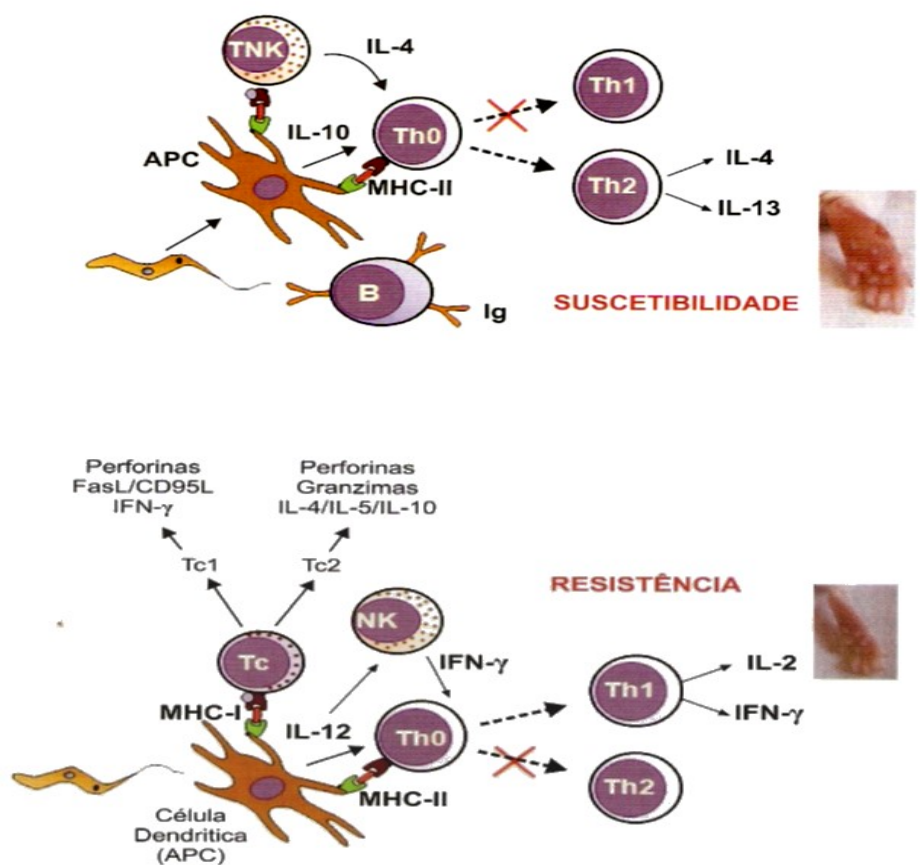
receptores (IFN- γ R), fatores de transcrição (T-BET, STAT-4), ou moléculas co-estimulatórias (CD40-CD40L), levam a suscetibilidade a *Leishmania major*(KARP; JENKINS; SACKS, 2014).

Estudos demonstraram que a ausência de TNF ou o receptor para TNF (TNFR) em camundongos C57BL/6, fazem estes animais desenvolverem uma resposta Th1 funcional, capaz de controlar a carga parasitária(KANALY et al., 1999;NASHLEANAS; SCOTT, 2000; CHAKOUR et al., 2003).Entretanto, esses animais são incapazes de curar as lesões, indicando que o TNF também é muito importante na resolução da lesão inflamatória(ALLENBACH et al., 2008).

Sabe-se que a citocina IL-12 é uma citocina chave para a geração de uma resposta imune Th1. AIL-12p70 é secretada por células apresentadoras de antígeno e é formada pelas subunidades IL12p40 e IL12p35(TRINCHIERI & KASTELEIN, 2003). Foi relatado que camundongos deficientes nessas duas subunidades são incapazes de controlar a infecção(PARK et al., 2002).É necessário também que não somente a IL-12 inicie o desenvolvimento da resposta Th1, mas que também essa resposta seja mantida durante a infecção para que se desenvolva uma produção células Th1 efectoras e produtoras de IFN γ (PARK; HONDOWICZ; SCOTT, 2000;PARK et al., 2002;PAKPOUR; ZAPH; SCOTT, 2008).As células dendríticas tem um importante papel no controle da infecção, pois, produzem IL-12 e direcionam uma resposta local Th1, em camundongos C57BL/6(ASHOK et al., 2014;MARTÍNEZ-LÓPEZ et al., 2015).

Alguns estudos também demonstraram o papel dos receptores (TLR) e da molécula adaptadora MyD88. Os camundongos deficientes de MyD88, foram altamente suscetíveis à infecção por *L. major*, montando uma resposta Th2 (MURAILLE et al., 2003). O TLR9 mostrou-se ter um importante papel no controle da infecção *in vivo*(LIESE; SCHLEICHER; BOGDAN, 2007). Camundongos deficientes em TLR2 e TLR4 apresentaram lesões maiores do que camundongos controles selvagens, sugerindo que a deficiência de TLR2 permita a exacerbação da doença e da carga parasitária, direcionando para uma resposta imune do tipo Th2 (HALLIDAY et al., 2016)

Figura 6. Esquemática do perfil de células e citocinas envolvidas no padrão de resistência e suscetibilidade durante a infecção por *L. major*



Legenda : Padrão de suscetibilidade e resistência na infecção experimental por *L. major*
 Fonte: Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar das Américas, 2012.

Modelo de infecção para *L. braziliensis*

O modelo hamster tem sido utilizado para o estudo da leishmaniose visceral (Figura 7) pois reproduz em muitos aspectos a doença humana, inclusive em testes de fármacos e candidatos a vacinas (MELBY et al., 1998; KHARE et al., 2016; PAIK et al., 2016).

Estudos relacionados a resposta imune, mostraram que na primeira semana de infecção por *L. donovani* em hamsters, havia uma alta expressão de RNAm de citocinas do tipo 1 como IL-2, IFN- γ , TNF e IL-12. A expressão de IL-4 não foi aumentada em resposta a infecção, no entanto, havia uma alta expressão de IL-10 e TGF- β , sugerindo a contribuição na progressão da doença (MELBY et al., 2001)

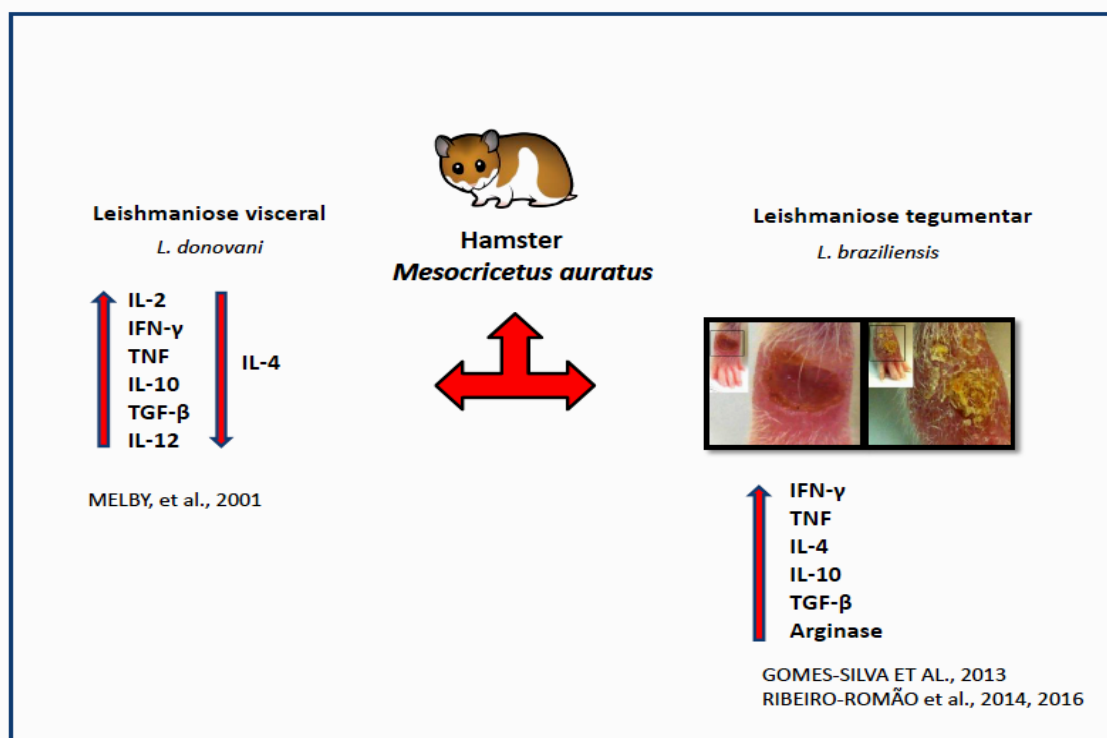
Poucos estudos experimentais tem sido conduzidos empregando-se parasitos do subgênero *Viannia*. Essa escassez deve-se ao fato da maioria de linhagens murinas, mesmo quando inoculadas com grande número de parasitos, mostram-se resistentes a essas espécies (MOURA et al., 2005; SALAY et al., 2007). Em camundongos BALB/c, as lesões progridem até a quarta semana de infecção e depois regridem espontaneamente, dificultando estudos de acompanhamento da lesão a longo prazo, como é o caso de testes de fármacos ou de vacinas.

O animal que representa melhor a leishmaniose tegumentar humana causada por *L. braziliensis* é o hamster sírio dourado (*Mesocricetus auratus*). Esses animais são mais suscetíveis a infecção e reproduzem tanto a forma clínica quanto as características histopatológicas da doença humana (KAHL et al., 1991; GOMES-SILVA et al., 2013; RIBEIRO-ROMÃO et al., 2014; MEARS et al., 2015). Por ser considerado um modelo *outbred* é esperado que características individuais tenham um importante papel nas diferentes respostas clínicas da doença, o que também representa a doença humana.

Um estudo com 34 hamsters infectados com *L. braziliensis* demonstrou que esses animais apresentaram úlceras similares às observadas na leishmaniose tegumentar americana. Achados histopatológicos do linfonodo mostraram reação granulomatosa, com macrófagos contendo amastigotas. Os linfócitos do sangue proliferaram *in vitro* na presença do antígeno e o aumento da lesão foi proporcional ao peso do baço (GOMES-SILVA et al., 2013). O inóculo com diferentes concentrações de *L. braziliensis* neste modelo animal gera diferenças no tempo de surgimento das lesões, na apresentação clínica e no comprometimento sistêmico. A alta concentração do inóculo contribui para o dano tecidual e está associado com a visceralização de *L. braziliensis*. Mesmo sem diferenças na carga parasitária do tecido da lesão e do linfonodo e nos níveis de IgG, há um aumento na expressão de IFN- γ nestes tecidos. (RIBEIRO-ROMÃO et al., 2014). Comparativamente, foi observado um aumento da expressão de RNAm de TGF- β , IFN- γ , iNOS, TNF, IL-4 e IL-10 e diminuição da expressão da Arginase na lesão em relação ao linfonodo. Esses achados sugerem um perfil misto de citocinas do tipo 1 e 2, indicando que esse balanço favorece a cronicidade da doença (RIBEIRO-ROMÃO et al., 2016). (Figura 7).

Embora o hamster seja considerado um bom modelo, existem limitações relacionadas ao maior custo de manutenção e, principalmente, a escassez de reagentes específicos, sobretudo anticorpos.

Figura 7. Esquematisação do perfil de citocinas do modelo *Mesocricetus auratus* na infecção por *L.donovani* e *L.braziliensis*



Legenda. Esquematisação do perfil de citocinas do modelo *Mesocricetus auratus* na infecção por *L. donovani* e *L. braziliensis*. Leishmaniose Visceral e Leishmaniose Tegumentar experimental.

Fonte: MELBY, 2001; GOMES-SILVA et al., 2013; RIBEIRO-ROMÃO et al, 2014; 2016.

TRATAMENTOS DA LEISHMANIOSE

Fármacos de uso clínico

O tratamento das leishmanioses iniciou-se em 1912, quando o médico brasileiro Gaspar Vianna introduziu o uso do tártaro emético, um antimonial trivalente. Os antimoniais sofreram mudanças para diminuir os efeitos tóxicos até o surgimento dos antimoniais pentavalentes. O antimoniato de meglumina ou Glucantime e o estibogluconato de sódio, ou Pentostam, tem sido utilizados no tratamento das leishmanioses há mais de 60 anos como fármacos de primeira escolha em vários países (WHO, 2010). O tratamento com antimoniais pentavalentes, possui efeitos tóxicos, tempo terapêutico longo, e crescente resistência do parasito (GROGL; THOMASON; FRANKE, 1992; SUNDAR, 2001; CROFT & COOMBS, 2003; PEREZ-FRANCO et al., 2016) (Tabela 4).

No Brasil, o ministério da saúde disponibiliza gratuitamente o antiomoniato de meglumina (Glucantime®), na rede pública de saúde, como medicamento de primeira escolha, exceto gestantes e pacientes coinfectados com HIV. Não havendo resposta satisfatória com o tratamento com este antimonial, os medicamentos de segunda escolha são a anfotericina B e o isotionato de pentamidina e recomenda-se o esquema terapêutico padronizado pela Organização Mundial de Saúde.

O mecanismo de ação dos antimoniais ainda não está totalmente estabelecido, mas sabe-se que age na forma amastigota e depende da redução do antimônio pentavalente em trivalente, dentro do macrófago. O modo de ação envolve a inibição da via glicolítica; de oxidação de ácidos graxos e também a inibição da tripanotona reductase (CROFT; COOMBS, 2003; AMATO et al., 2008; MISHRA; SAXENA; SINGH, 2012) (Tabela 4). Sabe-se que os antimoniais também são capazes de modular a resposta de fagócitos aumentando a fagocitose e fazendo com que estes aumentem a produção de TNF e conseqüentemente a produção de NO, o que pode contribuir para uma resposta terapêutica mais eficaz (MUNIZ-JUNQUEIRA & DE PAULA-COELHO, 2008; DE SALDANHA et al., 2012).

A anfotericina é um antibiótico poliênico que possui atividade antifúngica e leishmanicida. A administração da anfotericina B é intravenosa e as reações adversas incluem calafrios, febre, associada à miocardite e nefrotoxicidade (Tabela 4). As formulações da Anfotericina B como: anfotericina B lipossomal (AmBisome®), anfotericina B com dispersão coloidal (Amphocil®) e anfotericina B complexo lipídico (Abelcet®) foram desenvolvidas para reduzir os efeitos adversos e melhorar a farmacocinética e biodisponibilidade do fármaco. Embora apresentando uma menor toxicidade, estas formulações têm limitações, como por exemplo, o alto custo e a instabilidade a temperaturas mais altas (o que exige refrigeração). Esses fatores inviabilizam seu uso em áreas endêmicas (DORA & SOUZA, 2005; BALDOMINOS; GONZÁLEZ; MARI, 2015). O mecanismo de ação da anfotericina B envolve sua ligação ao ergosterol, principal esterol presente na superfície da *Leishmania*, com conseqüente alteração de permeabilidade de membrana e do equilíbrio osmótico do parasito (MINODIER & PAROLA, 2007; MUKHERJEE et al., 2010; CROFT; OLLIARO, 2011)

A pentamidina é uma poliamina derivada da amidina, eficaz contra vários protozoários patogênicos, incluindo *Leishmania*. Na Guiana Francesa, é considerada a droga de primeira escolha, onde mais de 90% das infecções são causadas por *L. guyanensis* (MONGE-MAILLO; LO'PEZ-VE'LEZ, 2013). No Brasil, ensaios clínicos apontaram uma boa eficácia nos casos adquiridos no Brasil por *L. guyanensis* (GADELHA et al., 2015). A pentamidina interfere na

síntese do DNA do parasito, modificando a morfologia do cinetoplasto(MURRAY et al., 2005; DE MENEZES et al., 2015).Seus efeitos tóxicos incluem dores, náuseas,vômitos, hipertensão,diabetes, mialgia e é uma terapia de alto custo(DE MENEZES et al., 2015).

A miltefosina é um fármaco que inicialmente foi utilizado na terapia antitumoral,mas na década de 80 foi testado e mostrou-se ativa contra *Leishmania*(CROFT& ENGEL, 2006; MONGE-MAILLO& LOPEZ-VELEZ, 2015). É o primeiro medicamento utilizado pela via oral reconhecido para o tratamento das leishmanioses. Em 2002, foi registrado para o tratamento da leishmaniose visceral na Índia, onde é utilizado como fármaco de primeira escolha para essa forma clínica(BERMAN, 2008;DE MENEZES et al., 2015). Em 2013, O comitê de *food and drugs administration* (FDA), votou a favor da miltefosina para o tratamento de leishmaniose visceral causada por *L. donovani*, leishmaniose cutânea e mucosa causada por membros do subgênero *viannia* (*L. braziliensis*, *L. guyanensis* e *L.panamensis*) .Em março de 2014, o FDA aprovou o uso da miltefosina para o tratamento da leishmaniose tegumentar e visceral em pacientes maiores de 12 anos (FDA, 2014).No Brasil, em novembro de 2016,os membros da CONITEC (Comissão nacional de incorporação de tecnologia no SUS) presentes na 50ª reunião extraordinária, decidiram por unanimidade recomendar a incorporação da miltefosina para o tratamento de pacientes com leishmaniose tegumentar (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). Recentemente, foi aprovado pelo ministério da agricultura, para o uso na leishmaniose visceral canina, com a denominação de Milteforan®.O mecanismo de ação da miltefosina envolve o metabolismo de lipídeos do parasito e consequentemente causando a sua morte por apoptose(PARIS et al., 2004; VERMA; DEY, 2004; VERMA; SINGH; DEY, 2007). Entretanto, alguns estudos mostram que a miltefosina age também modulando a resposta de macrófagos de camundongos BALB/c infectados com *L. donovani* e *L. amazonensis*(WADHONE et al., 2009; PONTE et al., 2012).

No Brasil, em um estudo clínico que visou avaliar a eficácia da miltefosina na leishmaniose cutânea causada por *L. braziliensis* em adultos e crianças, observou-se uma melhor eficácia após o tratamento com a miltefosina em comparação ao tratamento com antimonial. Os pacientes maiores de 12 anos apresentaram uma melhor resposta ao tratamento com a miltefosina (MACHADO et al., 2010).

Os efeitos adversos da miltefosina estão relacionados ao trato gastrointestinal, levando a sintomas como: anorexia, diarreia, vômitos. Estudos experimentais indicam riscos embriotóxicos, fetotóxicos e teratogênicos, sendo contra - indicada para mulheres grávidas (MONGE-MAILLO & LOPEZ-VELEZ, 2015).

Tabela 4. Fármacos utilizados no tratamento da leishmaniose e seu modo de ação

Fármaco	Vantagens	Desvantagens	Mecanismo de ação
Antimoniais pentavalentes	-Baixo custo -É permitido o uso em associação com anfotericina para gestante e idosos	Resistência na Índia- Comprometimento cardíaco Artralgia, mialgia, toxicidade renal e hepática	-Inibição da via glicolítica -oxidação de ácidos graxos - Inibição da tripanotona redutase (CROFT; COOMBS, 2003)
Anfotericina B desoxilato	Eficaz contra cepas resistentes ao antimônio	Internação Miocardite Toxicidade renal	Ligação aos ergosterol -Alteração permeabilidade de membrana, equilíbrio osmótico do parasito (MINOIDER &PAROLA, 2007)
Anfotericina B lipossomal	Não há casos de resistencia Eficaz com baixa toxicidade	Alto custo Toxicidade renal	
Pentamidina	Uso eficaz em associação em baixas doses	Toxicidade renal Miocardite Diabetes Mellitus	Interferência na síntese de DNA do parasito (MURRAY et al., 2005)
Miltefosina	Tratamento oral	-Toxicidade fígado e rins Complicações gastrointestinais Contra indicado para gestantes	Metabolismo de lipídeos Morte do parasito por apoptose (PARIS et al., 2004)
Paromomicina	Baixo custo Possibilidade de uso tópico	Ototoxicidade reversível Dor no local da injeção hepatotoxicidade	Afeta o potencial de membrana mitocondrial; inibe síntese de proteínas (JHINGRAN et al.,2009)

Fonte: Adaptado de NAGLE et al., 2014.

A paromomicina é um antibiótico, utilizado para infecções bacterianas cuja atividade anti-leishmania foi estudada na década de 1960, demonstrando sua atividade em estudos clínicos (MATTOCK & PETERS, 1975; MISHRA; SAXENA; SINGH, 2012). Em 2006, seu uso foi licenciado na Índia para tratamento de pacientes com leishmaniose visceral e já foi utilizada como uso tópico na leishmaniose tegumentar causada por *L. major*, *L. tropica* e *L. aethiopica* (RICHARD; WERBOVETZ, 2010). Entretanto, atualmente o uso tópico na leishmaniose tegumentar não é recomendado, exceto em casos de infecção com *L. mexicana*, ou pela possibilidade de desenvolvimento de lesões mucosas em pacientes infectados por *L. braziliensis* ou *L. panamensis* (REITHINGER et al., 2007). O esquema terapêutico é de 15 mg/kg dia para uso tópico, durante 21 dias ou 20 mg/kg, para uso intramuscular, durante 17 dias,

para leishmaniose visceral. Os principais efeitos incluem severa nefrotoxicidade, ototoxicidade e hepatotoxicidade (DE MENEZES et al., 2015).

O modo de ação da paromomicina em *Leishmania* ainda não é totalmente elucidado, sabe-se que em bactérias, inibe a síntese de proteínas através de sua interação com subunidades de RNA ribossomal (DAVIS, 1987). Em *Leishmania* estudos tem revelado que a paromomicina afeta o potencial de membrana mitocondrial, inibindo a síntese de proteínas, alterando a fluidez de membrana e o metabolismo de lipídeos (JHINGRAN et al., 2009). Já foram relatadas, em estudos experimentais cepas de *Leishmania* resistentes a paromomicina (BHANDARI et al., 2014; HENDRICKX et al., 2014).

O arsenal terapêutico para a leishmaniose ainda possui muitas limitações, como as vias de administração utilizadas, a toxicidade, a adesão dos pacientes, o custo do tratamento, além do surgimento de cepas resistentes aos medicamentos. Desta maneira, é necessário o incentivo à descoberta de novos fármacos, a fim de reduzir os efeitos tóxicos e tornar o custo acessível, sobretudo em países subdesenvolvidos ou em desenvolvimento, que apresentam endemicidade.

FÁRMACOS EM ESTUDO

Terapia combinada e recondução de fármacos

A terapia combinada consiste no uso de dois ou mais fármacos com efeitos aditivos e sinérgicos, e mecanismos de ação distintos. O objetivo é aumentar a eficácia terapêutica, possibilitando reduzir a dose e a duração do tratamento, que resulta em menor toxicidade (OMS, 2010; TRINCONI et al., 2014). A DNDi (Drugs of neglected diseases initiative), incentivou novos estudos de esquemas de terapia combinada.

Em 2010, A DNDi recomendou o uso da combinação do estibogluconato de sódio e paromomicina como tratamento de primeira linha na África Oriental. Em 2015, esse esquema de tratamento indicou um índice de cura de 86% em 6 meses (ATIA et al., 2015), porém, neste mesmo estudo, um número relevante de pacientes co-infectados com HIV, gestantes e portadores de insuficiência renal, foram excluídos do estudo, indicando a necessidade de pesquisas por novas drogas. Na Índia, a combinação da anfotericina B com miltefosina e / ou paromomicina em pacientes com leishmaniose visceral, obteve resultados satisfatórios e todas as combinações testadas foram bem toleradas, sendo 95 % mais eficazes do que o tratamento com somente um medicamento (SUNDAR et al., 2011). Um outro estudo na Índia recomendou uma dose única de anfotericina B® lipossomal como

primeira opção de tratamento, junto com a terapia combinada de paromicina e miltefosina abandonando a monoterapia com miltefosina (TEMPONE et al., 2017).

O allopurinol, um medicamento oral utilizado na terapia contra a gota, mostrou-se eficaz, na leishmaniose causada por *L. major*, em um tratamento combinado usando a metade da dose do antimonial (MOMENI & AMINJAVAHERI, 2003). A diminuição das doses do antimonial, 8mg/kg/dia combinado com o allopurinol, mostrou-se mais efetivo do que o antimonial ou o allopurinol administrados isoladamente (ESFANDIARPOUR & ALAVI, 2002). O allopurinol age no metabolismo de purinas, bloqueando a via das purinas em amastigotas de *Leishmania*, causando a morte do parasito (BALAÑA-FOUCE et al., 1998). Nos últimos anos, foram realizados estudos utilizando o allopurinol em terapia combinada com a miltefosina na leishmaniose visceral canina, demonstrando uma maior eficácia (MANNA et al., 2015; PROVERBIO et al., 2016).

A procura de fármacos utilizados em outras doenças com ação leishmanicida, é baseado no mecanismo de ação desses fármacos com possível alvo em *Leishmania*. Alguns exemplos incluem inibidores de proteínas cinases (SANDERSON; YARDLEY; CROFT, 2014) e inibidores da síntese de esteróis, como os azóis. Entre os antifúngicos, estudos tem sido feitos com cetaconazol (BERMAN et al., 1986; EIRAS; KIRKMAN; MURRAY, 2015), itraconazol (KHAZAELI et al., 2014) e fluconazol (DALY et al., 2014). Alguns fármacos anti-micobactéria como clofazimina e delamanid (EVANS et al. 1989; KAISER et al., 2015; PATTERSON et al., 2016) foram relatados com ação antileishmania.

Dentre o grupo de moléculas chamadas SERM (*selective estrogen receptor modulators*) e um exemplo mais estudado é o fármaco tamoxifeno, utilizado contra o câncer de mama e que é ativo contra todas as espécies de *Leishmania* (MIGUEL; YOKOYAMA-YASUNAKA; ULIANA, 2008; MIGUEL et al., 2009, 2011; DOROODGAR et al., 2016). O mecanismo de ação deste fármaco ainda não foi totalmente bem estabelecido, porém sabe-se que o fármaco reduz a acidificação do vacúolo parasitóforo, alcalinizando este ambiente que normalmente é um ambiente ácido (MIGUEL et al., 2007). Estudos mostraram que a associação deste fármaco com a miltefosina em camundongos infectados com *L. amazonensis* é mais eficaz que a monoterapia (TRINCONI et al., 2016). A associação com a anfotericina B no mesmo modelo animal, mostrou que baixas doses resultaram em boas respostas clínicas e parasitológicas (TRINCONI et al., 2014).

A azitromicina é um antibiótico utilizado pela via oral, que experimentalmente apresentou atividade *in vitro* e *in vivo* contra *L. major*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. chagasi* (OLIVEIRA-SILVA; MORAIS-TEIXEIRA; RABELLO, 2008).

O fármaco amiodarona, indicado no caso de arritmias, foi eficaz contra promastigotas e amastigotas de *L. mexicana*. *In vivo*, diminuiu a carga parasitária de camundongos infectados tratados com amiodarona e miltefosina (SERRANO-MARTÍN et al., 2009). A amiodarona desequilibra a homeostase de cálcio no parasito e a biossíntese de esteróis em *L. mexicana* (XENÓN SERRANO-MARTÍN et al., 2009).

A iminazoquinolina ou imiquimod é um composto antiviral usado para o tratamento tópico de verrugas genitais causadas pelo papilomavírus humano (HPV). É um imunomodulador que estimula a produção de citocinas do tipo 1 e NO em macrófagos. Em infecções experimentais, o imiquimod demonstrou eficácia diminuindo o número de amastigotas em macrófagos infectados por *L. donovani* e diminuiu o tamanho da lesão em camundongos infectados por *L. major* (BUATES; MATLASHEWSKI, 1999). Também foi capaz de melhorar a eficácia do glucantime na infecção experimental por *L. major*, quando utilizado em associação (KHALILI et al., 2011).

A pentoxifilina é um vasodilatador, utilizado no tratamento de insuficiência vascular e tem sido utilizado experimentalmente no tratamento de algumas doenças inflamatórias. A pentoxifilina inibe o fator de transcrição NF- κ B, bloqueando a produção de TNF que contribui para reduzir o processo inflamatório. A pentoxifilina também mostrou-se eficaz quando associada ao antimonial no tratamento de 10 pacientes com leishmaniose mucosa resistente a mais de três séries de tratamento com o antimonial utilizado isoladamente (LESSA et al., 2001). Em um estudo experimental com camundongos C57BL/6 infectados com *L. amazonensis*, o grupo tratado com pentoxifilina e miltefosina apresentou maior eficácia do que o grupo tratado somente com a miltefosina (ANGÉLICA et al., 2014). Na Colômbia, em um estudo *ex-vivo*, utilizando células mononucleares do sangue periférico de pacientes com leishmaniose cutânea causada por *L. panamensis*, a pentoxifilina mostrou um efeito supressivo de citocinas como TNF- α , IFN- γ e IL-13 nas células tratadas com pentoxifilina e esse efeito foi conservado quando o tratamento era combinado com a miltefosina (GONZALEZ-FAJARDO et al., 2015).

Os antidepressivos sertralina e imipramina, também demonstraram eficácia em estudos experimentais com *L. donovani*. *In vitro*, tiveram eficácia antipromastigota e antiamastigota. Os camundongos BALB/c infectados e tratados pela via oral com sertralina tiveram redução da carga parasitária no fígado e no baço (PALIT & ALI, 2008) e hamsters infectados e tratados com imipramina tiveram redução de 90% da carga parasitária (MUKHERJEE et al., 2012).

Produtos naturais e seus metabólitos com ação anti-Leishmania

As plantas são fontes de moléculas biologicamente ativas. Algumas plantas utilizadas pela medicina popular para o tratamento de doenças de pele apresentam atividade antileishmania, como por exemplo plantas dos gêneros: *Acanthospermum*, *Ageratum* (NOUR et al., 2010) *Aloe* (DUTTA et al., 2008) *Artemisia* (SEN et al., 2007), *Copaifera* (DOS SANTOS et al., 2011) entre outras (PASSERO et al., 2012). O extrato de partes aéreas de *Acanthospermum hispidum* (Asteraceae) foi capaz de diminuir o crescimento de promastigotas de *L. mexicana* (BERO et al., 2011). O extrato puro e flavonoides purificados de *Ageratum conyzoides* (Asteraceae) foram efetivos contra *L. donovani*, no entanto o extrato puro apresentou maior eficácia (BERO et al., 2011). Já o extrato de *Aloe vera* (Liliaceae) apresentou efeito anti-Leishmania em várias espécies dermatópicas causadoras da leishmaniose cutânea e mucosa como *L. braziliensis*, *L. tropica*, *L. major*, *L. amazonensis*. Em *L. donovani*, o extrato de *Aloe vera* tem efeitos inibitórios em amastigotas axênicas (DUTTA et al., 2007a) e é capaz de induzir a morte celular em promastigotas (DUTTA et al., 2007b). A eficácia *in vivo* foi demonstrada através da redução da parasitemia em camundongos BALB/c infectados com *L. donovani* (DUTTA et al., 2008). Possui também efeito inibitório em promastigotas e amastigotas de *L. infantum* (RONDON et al., 2011).

Vários estudos mostram a atividade do extrato e óleos essenciais de *Artemisia* (Asteraceae) em *Leishmania*. Óleos essenciais de *Artemisia alba* foram testados *in vitro* pela primeira vez contra promastigotas de *L. donovani* e *L. major* (HATIMI, 2001). Em *L. donovani*, *Artemisia annua* mostrou eficácia *in vitro* e o mecanismo de ação relacionado com a indução de apoptose (SEN et al., 2007; ISLAMUDDIN et al., 2014). *In vivo*, o tratamento em camundongos infectados com *L. donovani* foi capaz de reduzir a carga parasitária e agir como imunomodulador, induzindo uma resposta do tipo 1, capaz de conter a replicação de *Leishmania* (ISLAMUDDIN et al., 2014, 2015).

O óleo de copaíba produzido por plantas do gênero *Copaifera* (Fabaceae) apresentou efeito em *Leishmania amazonensis* perda da viabilidade celular e dano mitocondrial (NAKAMURA et al., 2012). Estudos em camundongos BALB/c infectados mostraram que o tratamento pela via oral com o óleo de copaíba diminuíram o tamanho da lesão da pata desses animais (DOS SANTOS et al., 2011).

Entre as plantas utilizadas contra doenças tropicais na Amazônia estão plantas do gênero *Allium*, *Baccharis*, *Piper* e *Croton* entre outros (PASSERO et al., 2014). Em 2006, Gazanfari et al, demonstraram o efeito anti-leishmania de *Allium sativa* (Liliaceae) em *L. major*. O extrato de *Allium sativa* administrado por via intraperitoneal em uma única

doseem camundongos BALB/ c infectados com *L. major* foi capaz de aumentar o número de macrófagos peritoneais, aumentar a fagocitose e destruição de amastigotas intracelulares (GHAZANFARI; HASSAN; KHAMESIPOUR, 2006). A combinação do tratamento com Glucantime com o extrato de *Allium sativa* em camundongos infectados com *L. major* mostrou melhor atividade terapêutica que o tratamento com glucantime isolado. Sugeriu-se uma ativação de linfócitos T e macrófagos com a participação de NO, permitindo a destruição dos parasitos (GHAZANFARI et al., 2000).

O extrato metanólico de *Allium sativa* administrado por 28 dias por via oral, foi efetivo em diminuir a lesão da pata e carga parasitária de camundongos BALB/c infectados com *L. major* e a carga parasitaria de hamsters infectados com *L. donovani* (WABWOBA et al., 2010). O extrato aquoso de *Allium cepa* foi eficaz contra formas promastigotas de *L. major* (SADEGHI-NEJAD; SAKI; AZISH, 2014).

O óleo essencial de *Croton cajucara* (Euphorbiaceae) foi capaz de diminuir o crescimento de promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*. O tratamento de macrófagos murinos aumentou a produção de NO sugerindo estar relacionado com o efeito antiamastigota (MENDONC et al., 2003). Em *Leishmania chagasi*, o óleo essencial foi eficaz em promastigotas e amastigotas (RODRIGUES et al., 2013).

Plantas do gênero *Baccharis* demonstraram alto potencial em inibir o crescimento de *L. chagasi*, *L. amazonensis*, *L. major* e *L. braziliensis* (GRECCO et al., 2012). O tratamento de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* com uma fração purificada de *Baccharis uncinella* foi capaz de diminuir a carga parasitária e estimular a produção de IL-12 e IFN- γ , aumentando a resposta do tipo 1 nesses animais (YAMAMOTO et al., 2014).

Muitos estudos com plantas do gênero *Piper* mostram a atividade antileishmania, possivelmente relacionado com a indução da morte por apoptose. Compostos de *Piper aducum* apresentaram atividade em *Leishmania amazonensis* *in vitro* e *in vivo* diminuindo o tamanho da lesão e a carga parasitária (TORRES-SANTOS et al., 1999)

Estudos com a planta *Kalanchoe pinnata*, que é popularmente conhecida como saião, foram realizados em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis*. O extrato aquoso quando administrado por via oral inibiu o crescimento da lesão (DA SILVA et al., 1995). O mecanismo de ação deste extrato foi correlacionado com a estimulação da produção de NO (DA-SILVA et al., 1999). Na leishmaniose visceral experimental em camundongos BALB/c, o tratamento oral com o extrato aquoso mostrou uma redução da carga parasitária do baço e do fígado, aumento dos níveis de IFN- γ e produção de óxido nítrico pelos macrófagos infectados (GOMES ; MUZITANO; COSTA, 2010)

Os metabólitos secundários tem importante papel na adaptação das plantas ao seu ambiente e contribuem com a sua interação com outros organismos, além de aumentar a probabilidade de uma espécie sobreviver. Os metabólitos secundários podem atuar como antibióticos, antifúngicos e antivirais para proteger as plantas de patógenos (FUMAGALI et al., 2008). Estes metabólitos de plantas são geralmente classificados de acordo com a sua rota biossintética nas seguintes classes principais: terpênicos, fenólicos, esteroides e alcalóides. Por apresentarem diversas atividades biológicas, essas classes são importantes salvas de pesquisa científica para novos fármacos antimicrobianos e antiparasitários (AMARAL et al., 2006).

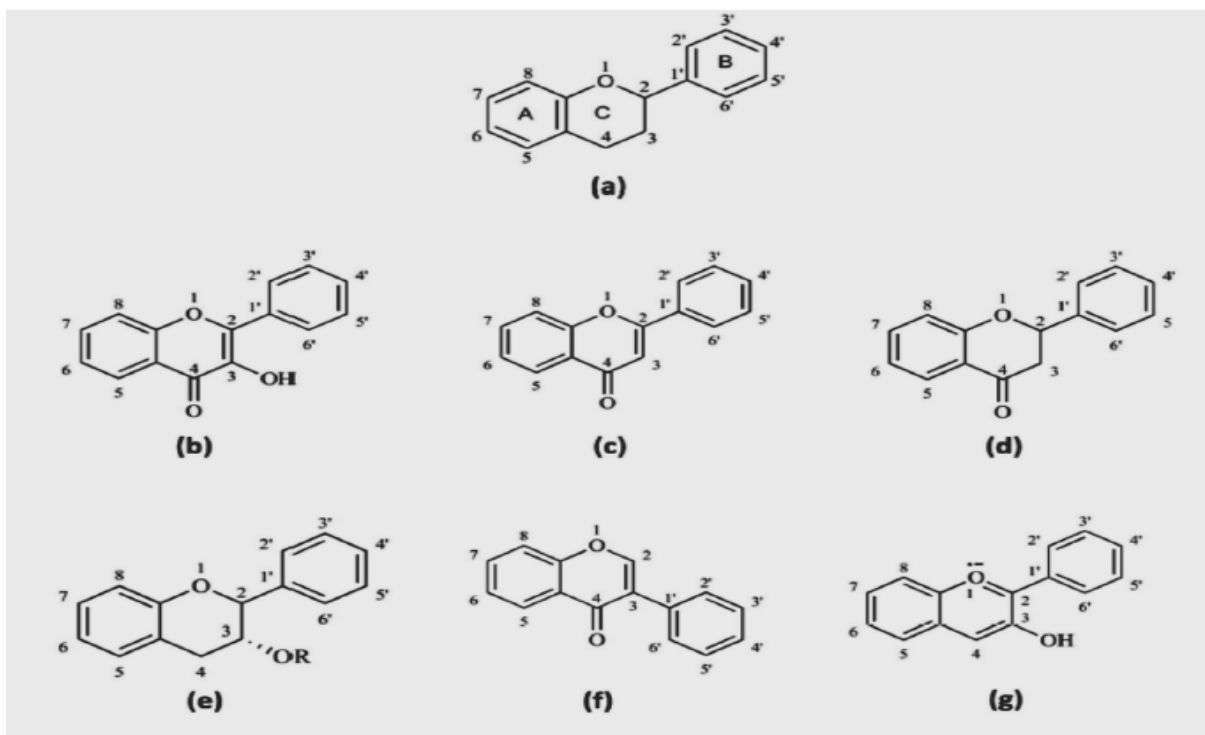
Alcalóides de *Thamnosma rhodesica* (Rutaceae), foram ativos contra formas promastigotas e amastigotas de *L. major* (AHUA et al., 2004). As espécies *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. donovani* apresentaram sensibilidade *in vitro* aos alcalóides isolados de *Zanthoxylum chiloperone*. Os camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* tratados por via oral e intraperitoneal, com esses alcalóides tiveram redução na carga parasitária (FERREIRA et al., 2002). Um alcalóide isolado de *Atoncephalus cadamba* mostrou-se capaz de inibir a topoisomerase II de *L. donovani* (KUMAR et al., 2016).

Os terpenóides isolados de Ivy (*Hedera helix*) mostraram atividade contra promastigotas e amastigotas de *L. infantum* (DELMASL et al., 2000) e também em *L. mexicana* (RIDOUX et al., 2001). Um terpenóide, denominado (-) α -bisabolol foi eficaz contra *L. amazonensis*, inibindo o crescimento de amastigotas e promastigotas em baixas concentrações (ROTTINI et al., 2015). Derivados do terpenóide Betulina foram capazes de reduzir a viabilidade e a interação de *L. braziliensis* com a célula hospedeira (ALCAZAR et al., 2014) e terpenóides isolados da planta *Lantana camara* foram ativos contra promastigotas de *L. major* (BEGUM et al., 2014).

FLAVONÓIDES

Os flavonóides são compostos fenólicos (Figura 8) cuja estrutura básica consiste de 15 carbonos distribuídos em dois anéis aromáticos (anéis A e B) interligados a uma estrutura central, o anel pirano (anel C) (SAITO et al., 2013). As principais classes de flavonóides são: os flavonóis, flavonas, flavanonas, flavanóis, antocianinas, isoflavonas (HUSSAIN et al., 2016) (Figura 8).

Figura 8. Estrutura química das principais classes de flavonóides



Legenda: Estrutura química das principais classes de flavonóides.(a) Estrutura básica dos flavonóides (b) flavonóis (c)flavonas (d) flavanonas (e) flavanóis (f)isoflavonas (g) antocianinas

Fonte: Adaptado de:(LEYVA-LÓPEZ et al., 2016).

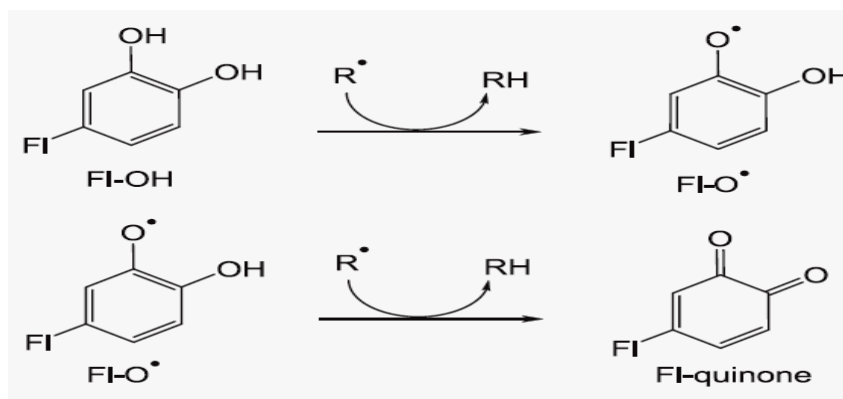
Com mais de 6000 representantes conhecidos, os flavonóides estão presentes na composição de frutas, vegetais, vinho, chás e café. Muitas interações animal/ planta são influenciadas pelos flavonóides. Por exemplo, os flavonóides são responsáveis pelas cores das flores e frutos, que tem a função de atrair polinizadores e dispersores de sementes, protegem contra a radiação UVB. Alguns flavonóides agem como moléculas sinalizadoras contra ataques de microorganismos (BRUNSWICK, 1999).

Atualmente, os flavonóides são alvo de grande interesse na pesquisa científica e farmacêutica, devido às suas atividades biológicas comprovadas. Entre essas atividades destacam-se as ações: anti-inflamatória (MASCARAQUE et al., 2014), antitumoral (FANTINI et al., 2015), antiviral (FRABASILE et al., 2017) antialérgica (HUSSAIN et al., 2016) e antioxidante (SHI et al., 2017). A propriedade mais descrita dos flavonóides é a sua ação antioxidante. Alguns flavonóides, como a luteolina podem agir como antioxidantes, eliminando o excesso dos radicais de oxigênio em células tumorais, protegendo-as da carcinogênese e modulando os mecanismos de sinalização

celular ligados a produção de ROS (PRATHEESHKUMAR et al., 2014). Esta ação está relacionada a sua capacidade dos flavonoides de realizar sequestro direto de espécies reativas de oxigênio, ativação de enzimas antioxidantes, quelação de metais, inibição de oxidases, redução do stress oxidativo e aumento das atividade antioxidantes de antioxidantes endógenos (PROCHÁZKOVÁ; BOU; WILHELMOVÁ, 2011).

Os flavonóides são capazes de sequestrar radicais livres diretamente pela doação de átomos de hidrogênio. Essa capacidade está relacionada com a sua estrutura química, em particular por hidroxilas que podem doar elétrons permitindo o deslocamento em torno do sistema aromático. Compostos com 2 ou 3 hidroxilas no anel benzênico possuem maior atividade antioxidante (SEKHER PANNALA et al., 2001). Os radicais se tornam inativos de acordo com a equação, onde $R\bullet$ é radical livre e $FI-O\bullet$ é um radical fenoxil, que pode reagir com um segundo radical tornando-se uma estrutura estável, a quinona (Figura 9).

Figura 9. Processo de sequestro de espécies reativas de oxigênio por uma flavonóide.



Legenda: Processo de sequestro de espécies reativas de oxigênio por um flavonóide. O radical $FI-O\bullet$ pode reagir com um segundo radical, tornando-se um radical estável com estrutura quinona. $R\bullet$ = radical livre, $FI-OH$ = flavonóide, $FI-O\bullet$ = radical fenoxil

Fonte: (PROCHÁZKOVÁ; BOUSOVÁ; WILHEMOVÁ., 2011).

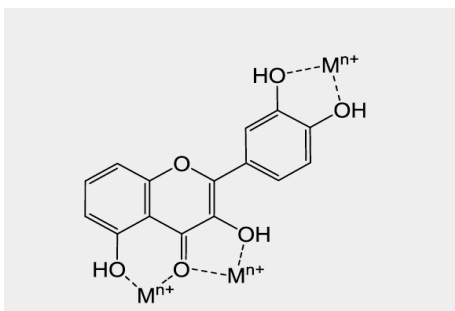
As espécies reativas de oxigênio interferem em várias funções celulares e um dos eventos mais importantes nessa interferência é a peroxidação lipídica, que resulta em danos na membrana celular, levando a célula à morte. O organismo conta com mecanismos antioxidantes para proteger a células desses danos, incluindo enzimas como superóxido dismutase, catalase e glutathiona peroxidase..

Os flavonóides podem agir através da interação com variadas enzimas detoxificantes, que protegem as células contra metabólitos endógenos e exógenos. Estas enzimas detoxificantes são: NADPH quinona oxirredutase, glutathiona s- transferase e UDP-glucuronosyl transferase (NERLAND,2007;PROCHÁZKOVA; BOUSOVÁ; WILHEMOVÁ., 2011).

Alguns flavonóides inibem a atividade da enzima iNOS, presente em macrófagos. A alta quantidade de óxido nítrico (NO) produzido pela enzima óxido nítrico sintase em macrófagos pode resultar em dano celular, pois macrófagos ativados aumentam consideravelmente a produção de NO e ânions superóxido (O_2^-) que reagem entre si produzindo peroxinitrito ($ONOO^-$), altamente danoso para a célula (NAKAZAWA; GENKA; FUJISHIMA, 1996). Os flavonóides podem preservar as funções benéficas do NO através da captura direta de ânions superóxido ou inibindo a expressão de iNOS, resultando em um dano menor para a célula (JUNIOR et al., 2014). Flavonóides como narigenina, daidzenina, kaempferol, quercetina e cardamomina inibem a expressão do RNA e produção de iNOS e conseqüentemente a síntese de NO em macrófagos murinos ativados por LPS (CAMUESCO et al., 2004; CHEN et al., 2005; TAKAHASHI; YAMAMOTO; MURAKAMI, 2011; LIN; CHANG, 2012; AZUMA et al., 2013).

Alguns flavonóides específicos, como a quercetina, são conhecidos por quelar metais como ferro e cobre e assim remover o principal fator para o desenvolvimento de radicais livres (PIETTA et al., 2000). O sítio de ligação para metais na estrutura dos flavonóides são: o grupo catecol no anel B, grupos 3- hidroxil e 4 -oxo no anel heterocíclico C e grupos 4-oxo e 5- hidroxil entre os anéis A e C (Figura 10).

Figura 10. Sítio de ligação para metais na estrutura de um flavonóide.



Legenda. Sítio de ligações para metais na estrutura de um flavonóide. o grupo catecol no anel B, grupos 3-hidroxil e 4-oxo no anel heterocíclico C e grupos 4-oxo e 5-hidroxil entre os anéis A e C
 Fonte: (PROCHÁZKOVA; BOUSOVÁ; WILHEMOVÁ.,2011).

As enzimas responsáveis pela produção de superóxido ($O_2^{\bullet-}$) como xantina oxidase e proteína cinase C, podem ser inibidas pelos flavonoides quercetina, silibina e luteolina resultando em uma diminuição do dano oxidativo (COS et al., 1998 ;SPANOU et al., 2012).

As atividades biológicas descritas atribuídas aos flavonóides, incluindo as propriedades antioxidantes e inibição de atividades enzimáticas justifica o fato de muitos flavonóides serem descritos como antiinflamatórios tanto *in vitro* como *in vivo*, reduzindo a severidade de muitos processo inflamatórios (KIM et al., 2004; RIBEIRO et al., 2015). A síntese das enzimas cicloxigenase (COX) e lipooxigenase (LOX), a partir da via do ácido araquidônico é o ponto inicial em uma resposta inflamatória, gerando os mediadores inflamatórios eicosanoides e prostaglandinas. Compostos fenólicos são capazes de inibir a via sintética da dessas duas enzimas (FERRFINDIZ; ALCARAZ, 1991; DZOYEM et al., 2015; LEYVA-LÓPEZ et al., 2016) e consequentemente os mediadores eicosanoides e prostaglandinas que estão envolvidos em respostas inflamatórias (DAMAS; BOURDON; LA-, 1985; DZOYEM et al., 2015; WANG et al., 2017).

Flavonóides também podem inibir a atividade da enzima NADPH oxidase (NOX), que é um complexo enzimático ligado a membrana celular de neutrófilos e macrófagos. O mecanismo de ativação inclui interação com um agonista com receptor específico na membrana celular destas células, ativação da fosfolipase C com subsequente formação de segundo mensageiros, que ativam a proteína cinase C. A proteína cinase C fosforila a subunidade p47phox de NOX que é um componente chave desta enzima, causando ativação da explosão respiratória (AGO et al., 2003; RASTOGI et al., 2017). Os flavonóides que são potenciais inibidores da proteína cinase C são: a quercetina, fisetina e

luteolina (FERRIOLA; CODY; MIDDLETON, 1989; PROCHÁZKOVA; BOUSOVÁ; WILHEMOVÁ., 2011; GIL-CARDOSO et al., 2016).

Assim como os flavonóides podem agir como antioxidantes, em certas circunstâncias podem agir como pró-oxidantes e promover oxidação de outros compostos. A atividade pró-oxidante de um flavonóide é diretamente proporcional ao número de grupos hidroxila na sua estrutura (CAO; SOFIC; PRIOR, 1997). Múltiplos grupos hidroxila, especialmente no anel B, aumentam significativamente a produção de radicais hidroxila na reação de Fenton (reação cuja geração de radicais hidroxila é feita pela decomposição de H_2O_2 catalizada por Fe^{+}) (CHOBOT et al., 2016). O ferro e o cobre são metais importantes presentes no corpo humano e fazem parte dos principais processos biológicos sendo parte de algumas proteínas e enzimas incluindo hemoglobina, citocromo c, citocromo P450. Quantidades extras de íon Ferro em uma célula pode ocasionar geração de ROS, através da reação de fenton. Os íons ferro geralmente são essenciais para muitos processos relacionados ao stress oxidativo em sistemas naturais, pois ele pode reagir com peróxido de hidrogênio para produzir radical hidroxila (reação de Fenton), um forte oxidante, que pode ser prejudicial para o DNA, lipídios e proteínas (EGHBALIFERIZ & IRANSHAHI, 2016).

Assim como o ferro, o cobre é um microelemento necessário para o nosso corpo em vários processos biológicos, participando de processos enzimáticos necessários para o metabolismo. Entretanto, seu excesso pode ser danoso para os processos biológicos podendo causar alterações histológicas e stress oxidativo. Um exemplo disso é que as células tumorais possuem uma alta concentração de cobre em comparação as células normais, tornando-as sensíveis a atividade pró-oxidante dos flavonóides. Muitos estudos *in vitro* sobre atividade pró-oxidante dos polifenóis são conduzidos na presença deste metal (AZMI et al., 2005; EGHBALIFERIZ & IRANSHAHI, 2016)

Flavonóides como isoliquiritigenina e quercetina, em baixas concentrações previnem o dano oxidativo em células, mas podem induzir a formação de ROS e citotoxicidade quando em altas concentrações em células tumorais (CHOI et al., 2001; SAK, 2013). Altas concentrações do reverastrol tem a capacidade de inibir o crescimento de células tumorais aumentando o nível de ROS, levando-as à morte por apoptose (MIKI et al., 2012; VENDRELY et al., 2017)

YEN et al (2003), observaram que flavonóis como a quercetina e a morina foram capazes de aumentara produção de H_2O_2 em linfócitos humanos, resultando no aumento da

peroxidação lipídica na membrana celular e consequentemente causar danos ao DNA(YEN et al., 2003;PROCHÁZKOVÁ; BOUŠOVÁ; WILHELMOVÁ, 2011).

Vários flavonóides e seus derivados apresentam reconhecida atividade anti-leishmania. Em um estudo feito com três espécies de plantas oriundas do cerrado: *Guazuma ulmifolia* Lam., *Luehea paniculata* e *Prockria crucis* e seus compostos fenólicos flavonóides como luteolina, apigenina e quercetina foram ativos contra *L. braziliensis* e *L. infantum in vitro*. A luteolina inibe o crescimento de promastigotas *in vitro* de *L. donovani*, inibindo a síntese de DNA, agindo na topoisomerase II, levando o parasito a morte por apoptose (MITTRA et al., 2000; SEN et al., 2006). A epigalocatequina, um flavonóide encontrado abundantemente no reino vegetal, foi eficaz em promastigotas e amastigotas de *L. braziliensis* induzindo a produção de ROS, promovendo a morte do parasito. O tratamento oral com epigalocatequina em camundongos infectados foi capaz de diminuir a lesão e a carga parasitária (INACIO et al., 2014). Em *L. amazonensis*, também produziu efeito semelhante *in vitro e in vivo*(INACIO et al., 2013) e também foi capaz de inibir a arginase deste parasito (DOS REIS et al., 2013).

O flavonóide apigenina foi eficaz *in vitro* contra promastigotas de *L. amazonensis* induzindo a produção de ROS e contribuindo para disfunção mitocondrial do parasito (FONSECA-SILVA et al., 2015) e em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, reduzindo o índice de infecção e induzindo a produção de ROS como parte do mecanismo de ação, além de apresentar eficácia *In vivo*, diminuindo a carga parasitária da lesão sem alterar os marcadores sorológicos de toxicidade (FONSECA- SILVA et al., 2016).

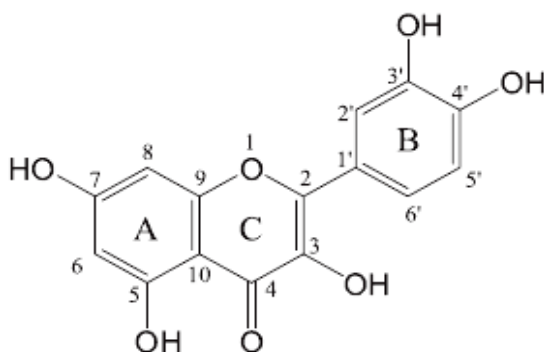
A quercetrina, um flavonóide glicosilado extraído do extrato aquoso de *Kalanchoe pinnata* foi capaz de inibir o crescimento de amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* (MUZITANO et al., 2006), e o mecanismo de ação é relacionado a inibição da arginase do parasito. Esta enzima é a primeira enzima envolvida na síntese de poliaminas, convertendo arginina em ornitina e uréia. A ornitina é utilizada na síntese de poliaminas que é essencial para multiplicação da *Leishmania* e detoxificação de ROS pela triponationa. A inibição da síntese de poliaminas causa stress oxidativo e permite o controle da infecção (DA SILVA; MAQUIAVELI; MAGALHÃES, 2012; (DOS REIS et al., 2013).

O Flavonóide Quercetina e suas atividades biológicas

O flavonóide quercetina é quimicamente designado 3,3',4,5,7 pentahidroxiflavona (Figura 11) e é o principal representante da subclasse flavonol.Sua coloração é amarela e pouco

solúvel em água. A quercetina é o flavonóide mais usado no tratamento de desordens metabólicas e inflamatórias. É encontrada em uma grande variedade de vegetais, frutas e folhas (BEHLING et al., 2004). Possui alta concentração em alimentos como cebola, couve, vagem, brócolis, repolho e tomate maçã, cereja, frutos como cranberry e blueberry e em bebidas como chás, suco de limão e vinho tinto (HERTOG et al., 1996; NIJVELDT et al., 2001). Devido a sua ampla diversidade de efeitos biológicos, a quercetina atualmente é vendida como suplemento alimentar.

Figura 11- Estrutura química da quercetina



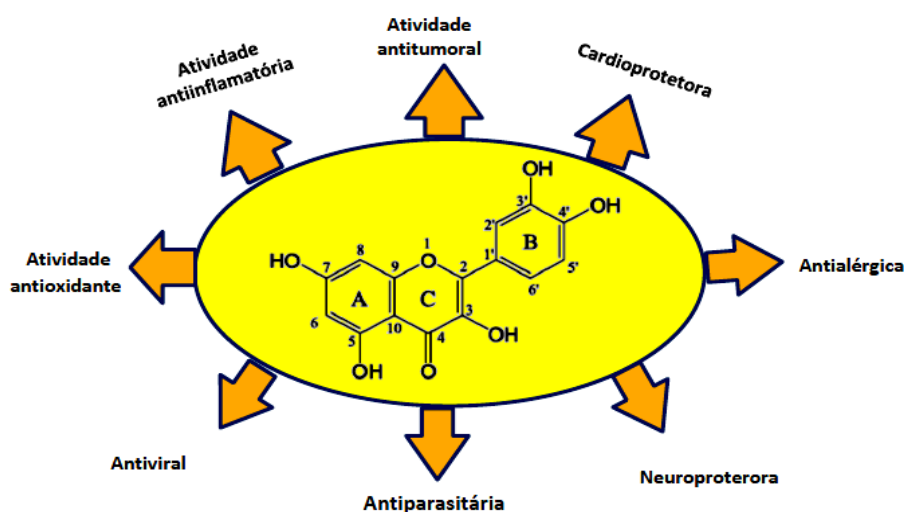
Legenda : 3, 3',4',5,7- pentahidroxi flavona. Estrutura química da quercetina
 Fonte: DO NASCIMENTO SIMÕES et al., 2013

Na dieta humana, a quercetina é encontrada como β - glicosídeo, pois contém um açúcar ligado na posição 3 do anel C. A forma glicosilada da quercetina é dificilmente absorvida no intestino delgado devido a hidrofobicidade. Essa forma é então hidrolisada por enterobactérias liberando sua forma aglicona, que é mais lipofílica e pode ser absorvida mais facilmente pelas células epiteliais do intestino (HOLLMAN, 2001; MUROTA; TERAO, 2003). Estudos mostram que após a absorção intestinal da quercetina na sua forma glicosilada ou aglicona, ocorre metabolização hepática gerando os metabólitos glucoronidato ou sulfato conjugado, que circulam no sangue e depois são excretados na bile ou na urina (MANACH et al., 1997; TEXIER et al., 1998).

A quercetina possui inúmeras atividades biológicas descritas (Figura 12), sendo as mais conhecidas as ações: antioxidante (BEHLING et al., 2004), pró- oxidante (SAK, 2013), anti-

inflamatória(LIN et al., 2017) antitumoral(SZLISZKA et al., 2008; FANTINI et al., 2015),hepatoprotetora(ZHANG et al., 2016b),cardioprotetora (KHURANA et al., 2013), neuroprotetora(HUEBBE et al., 2010), antialérgica (MAKINO et al., 2013) e antiviral(VAIDYA et al., 2016) e antiparasitária (MUZITANO et al., 2006, 2009).

Figura 12. Principais atividades biológicas da quercetina.



Legenda: Principais atividades biológicas da quercetina: Atividades anti-inflamatória, antitumoral, cardioprotetora, antialérgica, neuroprotetora e antiparasitária.

Fonte: A autora, 2017.

Assim como os outros flavonóides, a atividade antioxidante e anti-inflamatória da quercetina está relacionada com a inibição de enzimas COX(XIAO et al., 2011) e LOX (LAMIE et al., 2016) e também a inibição da enzima(iNOS)(KIM et al., 1999;CHEN et al., 2001; KORKOHONEN JR, 2005; QURESHI et al., 2011).

Além disso, a quercetina inibe a ativação do fator de transcrição NF-κB, fator multifuncional, que quando ativado por estímulos pro-inflamatórios, transloca-se para o núcleo da célula, onde promove a transcrição de genes incluindo de citocinas, quimiocinas e moléculas de adesão (LAWRENCE, 2009; ZHANG et al., 2016a ;XU, 2017).

Doses diárias de quercetina em ratos foi capaz de inibir a inflamação crônica e aguda e mostrou atividade anti-artrítica na artrite experimental, pela inibição de citocinas como TNF e óxido nítrico por macrófagos(GUARDIA et al., 2001; MAMANI-MATSUDA et

al., 2006; GARDI et al., 2015). Além disso, pode ser um adjuvante natural no tratamento desta doença, uma vez que inibe a ativação do fator NF κ B, consequentemente reduzindo o processo inflamatório (JI et al., 2013).

Na encefalomielite experimental murina, citocinas pró-inflamatórias, determinam a severidade da doença. O tratamento com a quercetina em camundongos com encefalomielite promove melhora, pelo bloqueio da sinalização para IL-12, através da via JAK/STAT. Isto resulta na inibição da produção da IL-12, diminuição da proliferação de linfócitos T e impedimento da diferenciação de linfócitos TCD4 em Th1 (MUTHIAN; BRIGHT, 2004).

A quercetina é capaz de suprimir a fosforilação da via de sinalização MAPK/ ERK em vários tipos de células (NGUYEN et al., 2004; AHN et al., 2008; SPANOU et al., 2012; RAFIQ et al., 2015). As MAPK fazem parte de um grupo de enzimas citoplasmáticas da família das proteínas quinases serina-treonina, transmitem sinais mitogênicos e de diferenciação celular (ALIAGA et al., 1999) e são ativadas em resposta a uma variedade de estímulos extracelulares, tais como LPS e citocinas inflamatórias (HOULISTON; PEARSON; WHEELER-JONES, 2001). Além disso, regulam atividades celulares como expressão de genes, diferenciação celular, embriogênese, mitose, migração, metabolismo e morte programada (JOHNSON & LAPADAT, 2013). As três principais MAPKs que participam do mecanismo de sinalização, incluem a via ERK, p38 e JNK. A ativação da MAPK-p38 e JNK está geralmente associada à apoptose, enquanto que ERK 1/2 inibe a atividade da apoptose (BALLIF; BLENIS, 2001). Por exemplo, a supressão do crescimento de células tumorais pela quercetina está correlacionado com a inibição da via de sinalização dessas enzimas (MAPKs) (LIM et al., 2017).

O efeito antitumoral da quercetina tem sido amplamente estudado. Um dos mecanismos de ação é induzir autofagia e apoptose em alguns tipos de células tumorais. Em células Hela, um tipo de célula de câncer cervical, a quercetina foi capaz de inibir sua proliferação e induzir autofagia em baixas concentrações (WANG et al., 2015b). Um mecanismo semelhante foi visto em carcinoma de célula renal (MENG et al., 2015; WANG et al., 2015^a) e em células de câncer de mama. Sabe-se que em células eucarióticas, o fenômeno de autofagia é importante para a manutenção do microambiente celular. Em condições homeostáticas, a autofagia promove a remoção de componentes celulares que podem se tornar tóxicos na célula. A desregulação da autofagia está associada a processos tumorais e este processo é regulado pela via de sinalização JNK (c-Jun N-terminal Kinase) (ZHOU et al., 2015).

Em células tumorais, é observada a persistência do perfil pró-oxidante, com altos níveis de ROS que são responsáveis pela manutenção do fenótipo de células cancerígenas. Esses níveis elevados de ROS fazem dessas células altamente suscetíveis a quercetina, que pode inibir a glutatona intracelular, aumentando ainda mais a quantidade de ROS intracelular, levando a célula à apoptose (GIBELLINI et al., 2010). Como relatado anteriormente, a quercetina é um flavonóide que pode ter a ação antioxidante ou pró-oxidante, dependendo do tipo celular, concentração e tempo de exposição..

Em estudos experimentais, em camundongos diabéticos, a administração intragástrica de quercetina, reduziu significativamente o ganho de peso corporal, os níveis séricos de glicose, insulina, colesterol total, triglicerídeos, alanino aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST). Além de atenuar o dano celular em hepatócitos em camundongos tratados (ZHANG et al., 2016c).

Devido a alta capacidade anti-inflamatória e antioxidante, a quercetina possui ação protetora em doenças cardiovasculares (RUSSO et al., 2012; GORMAZ; QUINTREMIL; RODRIGO, 2015). É capaz de inibir a agregação de plaquetas e manter o endotélio saudável, pode proteger também contra a doença coronariana e reduzir o risco de mortalidade causado pela lipoproteína de baixa densidade (LDL). Além disso, também possui propriedades relaxantes nas artérias que ajudam a reduzir a pressão sanguínea e prevenir o desenvolvimento de hipertrofia cardíaca (EDWARDS et al., 2007; MARUNAKA et al., 2017). Em um estudo clínico de seis semanas, a administração da quercetina a 150 mg/dia reduziu a pressão sistólica sanguínea e níveis de LDL em pacientes acima do peso que estavam em alto risco para doença cardiovascular (EGERT & BOESCH-SAADATMANDI, 2010).

Em modelos experimentais de miocardite autoimune a quercetina interfere, diminuindo a produção de citocinas pro-inflamatórias como TNF e IL-17 (MARINA et al., 2010), também é capaz de suprimir o stress oxidativo e ter função cardioprotetora (ARUMUGAM et al., 2012).

As doenças neurodegenerativas como Alzheimer's e Parkinson's são associadas com processos neuroinflamatórios no sistema nervoso central. Em um modelo experimental para a doença de Alzheimer's, a administração da quercetina, protegeu funções cognitivas e emocionais em camundongos (SABOGAL-GUÁQUETA et al., 2016). Também promoveu efeito protetor, na neurotoxicidade induzida por manganês em ratos (GAWLIK et al., 2017).

A quercetina possui também atividade anti-viral. O tratamento *in vitro* com a quercetina reduziu a infecção causada pelo vírus H1N1 e regulou a expressão de proteínas chave, incluindo fibronectina 1 e proibirina para reduzir a replicação viral (WAN et al., 2013; VAIDYA et al., 2016).

O efeito antialérgico da quercetina está relacionado com a supressão de citocinas inflamatórias e mediadores químicos como histamina (WENG et al., 2012; MAKINO et al., 2013)

Estudos experimentais demonstram a atividade antiparasitária da quercetina sobre tripanossomatídeos, envolvendo diversos alvos celulares (Tabela 5). Em *Trypanosoma brucei*, agente da tripanossomíase africana (doença do sono), a quercetina induziu apoptose do parasito, além de diminuir a resposta pró- inflamatória em macrófagos humanos (MAMANI-MATSUDA et al., 2004). A quercetina inibe a hexokinase deste parasito, uma enzima localizada no glicossoma, onde contém a maioria das enzimas que participam da glicólise, necessária para a produção de ATP de *T. brucei* (DODSON et al., 2012).

Em *L. donovani*, a quercetina interfere com o metabolismo do ferro e tem como alvo a enzima ribonucleotídeo redutase, que catalisa o passo limitante na síntese de desoxiribonucleotídeos para a síntese de DNA (SEN et al., 2008). A quercetina também é conhecida por ser um inibidor da topoisomerase, enzima que está envolvida na replicação e empacotamento do DNA. Foi demonstrado, que a quercetina é um inibidor da topoisomerase I (JEAN-MORENO et al., 2006) e topoisomerase II (MITTRA et al., 2000) de *L. donovani* levando o parasito a morte por apoptose. A inibição de topoisomerasas pela quercetina também foi observada em *L. panamensis*, uma espécie do Novo Mundo. (CORTÁZAR; COOMBS; WALKER, 2007).

Em *L. amazonensis*, a quercetina possui ação *in vitro* e *in vivo* (MONTRIEUX et al., 2014; MUZITANO et al., 2006, 2009a), sendo um dos alvos a enzima arginase, que está envolvida na síntese de poliaminas, que é essencial para a proliferação celular e detoxificação de ROS pela tripanotona (DA SILVA; MAQUIAVELI; MAGALHÃES, 2012). Em promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, o tratamento com quercetina aumenta a produção de ROS, levando o parasito a disfunção mitocondrial (FONSECA-SILVA et al., 2011, 2013).

Em *L. mexicana*, a quercetina mostrou-se capaz de inibir uma cisteína proteinase recombinante (cathepsina L), que é essencial para o ciclo de vida do parasito e para sua infectividade (DE SOUSA et al., 2015).

Tabela 5. Espécies de tripanosomatídeos e alvos da quercetina

Espécie	Alvo	Referência
<i>Trypanosoma brucei</i>	Induz apoptose do parasito Inibe TNF e NO em macrófagos Hexoquinase	MANANI-MATSUDA et al., 2004.
<i>L. donovani</i>	Metabolismo do ferro Ribonucleotídeo redutase Topoisomerase I e II	SEN ET AL., 2008 MITTRA et al., 2000
<i>L. panamensis</i>	Topoisomerase	CÓRTAZAR;COOMBS; WALKER, 2007
<i>L. amazonensis</i>	Arginase Produção de ROS	MUZITANO et al.,2006;2009 DA SILVA et al., 2012 FONSECA SILVA ET AL., 2011, 2013.
<i>L. mexicana</i>	Cathepsina L	DE SOUSA et al., 2015.

Legenda: Espécies de Tripanossomatídeos e alvos da quercetina

Fonte:A autora, 2017.

JUSTIFICATIVA

A *Leishmania braziliensis* é a principal espécie causadora de leishmaniose tegumentar no Brasil e possui larga distribuição em todo o território nacional. Além disso, esta espécie está correlacionada com a forma clínica mucosa que é de difícil tratamento, onde se observa forte e destrutiva resposta inflamatória na região orofaríngea resultante da exacerbação da resposta imune do hospedeiro. Nesse sentido é possível que moléculas com atividade anti-inflamatória ou imunomoduladora possam auxiliar e controlar a intensidade do processo inflamatório. Em várias espécies de tripanossomatídeos, é relatada a ação da quercetina, incluindo várias espécies de *Leishmania* e diferentes alvos biológicos. Desta maneira, é importante também o estudo exploratório com a *L. braziliensis*.

A atividade anti-inflamatória e imunomoduladora da quercetina é bem relatada. Em modelos experimentais como artrite, encefalomielite e miocardite, a quercetina é capaz de modular a resposta imune, promovendo melhora no quadro inflamatório ocasionado por essas doenças. A quercetina possui atividade antiparasitária em diversas espécies de *Leishmania* e possui diversos alvos celulares sobre esse parasito, incluindo indução da produção de espécies reativas de oxigênio. Dessa forma, é possível que a quercetina seja capaz de modular a resposta imune e também controlar a infecção por *Leishmania*.

Uma vez que no modelo de infecção com *L. major* é bem estabelecido os perfis de suscetibilidade e resistência, nas cepas de camundongos BALB/c e C57BL/6, esse modelo se torna útil na avaliação da resposta imune. Sendo assim é possível avaliar se o tratamento com a quercetina modula o perfil de citocinas produzidos pelos animais susceptíveis e resistentes à infecção por *Leishmania major*.

1.OBJETIVOS

1.1 Objetivo geral

Estudar a ação do flavonóide quercetina em modelos de infecção com *L. braziliensis* e *L. major*, com ênfase na sua capacidade imunomoduladora.

1.2. Objetivos específicos

Investigar a modulação de macrófagos tratados in vitro com a quercetina, analisando quanto à:

- a) Atividade microbicida
- b) Produção de espécies reativas de oxigênio (ROS);
- c) Produção de citocinas.

Avaliar o potencial terapêutico e imunomodulador da quercetina nos modelos experimentais, analisando:

- a) Eficácia do tratamento em diferentes momentos da infecção; e esquemas terapêuticos
- b) Tamanho da lesão;
- c) Carga parasitária;
- d) Produção de citocinas
- e) Marcadores séricos de toxicidade

2. METODOLOGIA

2.1 Flavonóide quercetina

A quercetina (MERCK) foi quimicamente analisada quanto a pureza e cedida pela Profª Sônia Soares Costa do Núcleo de Pesquisas de Produtos Naturais (NPPN) da Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ). Para uso *in vitro*, a quercetina foi solubilizada em Dimetilsulfóxido (DMSO). Nas culturas de célula, a concentração final de DMSO não ultrapassou 0,02%. Para administração pela via oral nos animais, a quercetina foi solubilizada em veículo aquoso Ora-plus(Perrigo ®).

2.2 Parasitos

2.2.1 *Leishmania braziliensis*

A *Leishmania braziliensis* cepa cão Thor (MCAN/BR/98/R619), foi isolada pela Drª Maria de Fátima Madeira e gentilmente cedida pela Drª Lea Cisne (IOC/FIOCRUZ Rio de Janeiro-RJ). Os parasitos foram mantidos e reisolados a partir de lesões de hamster golden infectados. As formas promastigotas foram cultivadas em meio Schneider's (Sigma-Aldrich) suplementados com 20 % de soro fetal bovino (Cultilab) e gamicina (80mg/ml), mantidos a 28°C com repiques semanais, sendo usadas até a 5ª passagem.

2.2.2 *Leishmania major*

A *Leishmania major* cepa LV39(MRHO/SU/59/P) foi isolada de lesões da pata de camundongos BALB/c infectados. As formas promastigotas foram cultivadas em meio Schneider's (Sigma-Aldrich) suplementados com 10 % de soro fetal bovino (Cultilab) e

garamicina (80mg/ml), mantidos a 28°C com repiques semanais, sendo usados até a 5ª passagem.

2.3 Considerações éticas

Os estudos realizados com animais foram aprovados pelo Comitê de Ética de Utilização de Animais do Instituto de Biologia Roberto Alcântara Gomes da UERJ, sob o protocolo (CEUA-07/2013-IBRAG-UERJ).

2.4 Animais

Os animais utilizados nos estudos, camundongos BALB/c e Hamsters (*Mesocricetus auratus*) foram obtidos do CECAL/ Fiocruz-RJ e os camundongos C57BL/6 obtidos da Universidade de São Paulo e mantidos no biotério da disciplina de parasitologia, da faculdade de ciências médicas- UERJ.

2.5 Ensaio da ação da quercetina em promastigotas

Promastigotas de *L. braziliensis* e *L. major* (5×10^5 / ml) foram distribuídas em triplicatas em placas de 24 poços (0,5ml/poço) ou 96 poços (0,1 ml/poço) e incubadas a 28°C durante 96 horas na presença de várias concentrações do flavonóide quercetina diluído em meio Schneider suplementado com 20% de soro fetal bovino para *L. braziliensis* e 10% para *L. major*. Controles foram parasitos cultivados somente com meio de cultura e soro e DMSO a 0,02% (concentração máxima utilizada para solubilizar a quercetina). Foi realizada a contagem diária em câmara de Neubauer em microscopia ótica. Alternativamente, foi adicionado 22 µl do reagente MTT (Brometo de tiazolil tetrazólio, Sigma, Sant Louis, USA) (5mg/ml). Um método colorimétrico baseado na redução deste composto por enzimas, formando cristais de formazana, que são solúveis em solventes orgânicos como o

DMSO(dimetilsulfóxido). Após 3 horas da adição do MTT, o DMSO foi adicionado, para a solubilização dos cristais de formazana e realizada a leitura a 570nm em espectrofotômetro.

2.6 Atividade sobre amastigotas intracelulares

Para avaliar a atividade sobre amastigotas intracelulares de *Leishmaniaspp*, os macrófagos residentes de peritônio de Hamster Golden ou camundongos BALB/c e C57BL/6, foram obtidos por lavagem peritoneal. Para tal, foi injetado meio de cultura RPMI gelado no peritônio dos animais, sendo 5 ml para camundongos e 10 ml para hamsters. Após a retirada do exsudato peritoneal, estes foram mantidos no gelo, e as células ajustadas para a concentração de 2×10^6 /ml e plaqueados em placas de 24 poços (0,5 ml/poço) com uma lamínula estéril de vidro no fundo de cada poço. Para a aderência, foram mantidos na estufa a 37° C, com 5% de CO₂ por uma hora (macrófagos de camundongos) ou overnight (macrófagos de hamsters) quando então foram removidas células não aderentes através da lavagem com PBS a 37°C. Foi realizado dois sistemas :

- A)** As células aderentes foram infectadas com promastigotas de *L. braziliensis* ou *L. major*, na razão de 5:1, por 4 horas a 37°C com 5% CO₂. Após 4 horas de infecção, monocamadas de macrófagos foram lavadas com solução tampão fosfato- salina(PBS) para remoção dos parasitos livres e foram tratadas ou não com as diferentes concentrações da quercetina por 48 horas em estufa a 37° C, com 5% de CO₂.
- B)** As células aderentes foram tratadas por 24 antes da infecção, após este período, as células foram incubadas por 24 horas com meio de cultura para retirada dos resíduos de quercetina e posteriormente infectadas na proporção de 5: 1 por 4 horas a 37°C com 5% de CO₂ e incubadas novamente com meio de cultura por 48 horas.

Após este período, as lamínulas foram submetidas a coloração com panótico (Laborclin®) e a atividade antimastigota foi avaliada microscopicamente, contando 100 macrófagos por amostra. Os resultados foram expressos como índice de infecção, utilizando a fórmula:

$$\text{Índice de infecção} = \frac{\% \text{ de células infectadas} \times \text{n}^\circ \text{ de amastigotas}}{\text{n}^\circ \text{ total de macrófagos}}$$

O cálculo de concentração inibitória para 50% (IC₅₀) foi feito por análise de regressão logarítmica no software *Graphpad Prism 5.0*. O índice de seletividade foi obtido pela razão

entre concentração que reduz a viabilidade celular para 50% dos macrófagos- concentração citotóxica(CC₅₀)e a concentração inibitória para 50% dos parasitos (IC₅₀.)

2.7Ação sobre o macrófago

2.7.1 Toxicidade

Para avaliar a partir de qual concentração a quercetina apresentaria algum efeito tóxico sobre os macrófagos, foi realizado um ensaio de viabilidade por meio da capacidade de reduzir o MTT.As células metabolicamente ativas convertem o MTT em cristais de formazana pela clivagem do anel tetrazólico pelas desidrogenases mitocondriais. Para isto, uma monocamada de macrófagos (como descrito no item 6.6) de camundongos/ hamsters, foi preparada em placas de 96 poços. As monocamadas foram submetidas ao tratamento com a quercetina em diferentes concentrações durante 48 horas a 37°C/5%CO₂. Após este período, foram adicionados 20µl do MTT (5 mg/ml) e a placa foi incubada durante 3 horas a 37°C/5%CO₂. Posteriormente, o sobrenadante foi retirado e adicionado 175µl de DMSO, para solubilizar os cristais de formazana. Em seguida, a absorvância foi mensurada a 570nm em espectrofotômetro.

O cálculo de CC₅₀ foi feito por análise de regressão logarítmica no software *Graphpad Prism 5.0*

2.7.2 Produção de espécies reativas de oxigênio

A avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio foi realizada nas monocamadas de macrófagos tratados com a quercetina. Os sistemas testados foram: macrófagos tratados por 24 horas, macrófagos tratados por 48 horas e tratados após a infecção por 48 horas. Os experimentos foram realizados utilizando placas de 96 poços. Ao final do tratamento, os poços foram lavados 2 vezes com PBS e a placa foi incubada por 30 minutos com a sonda H₂DCFDA (2',7'-diacetato de diclorodihidrofluoresceína) que na presença de ROS passa por

reações de clivagem e oxidação, sendo convertido para DCF (2',7'-diclorofluoresceína), sua forma fluorescente. Após 30 minutos, a placa foi levada ao um espectrofluorímetro (Spectra Max M2- Molecular Devices, Silicon Valley, USA), utilizando os comprimentos de onda 507 nm para excitação e 530 nm para emissão. O controle positivo utilizado foi o sistema glicose/glicose oxidase. O resultado foi expresso como unidade relativa de fluorescência.

2.7.3. Produção de Peróxido de Hidrogênio

Utilizando os mesmos sistemas de tratamento do item 6.7.2, utilizamos a sonda *Amplex red*, para a avaliação da produção de peróxido de hidrogênio. Na presença da peroxidase. Amplex® Red reage com peróxido de hidrogênio para produzir um produto da oxidação vermelho fluorescente, a resofurina. Após o término do tratamento realizado, os poços foram lavados 2 vezes com PBS e a placa foi incubada por 30 minutos com *Amplex red* e a leitura feita em um fluorímetro com comprimento de onda de excitação 560 nm e onda de emissão 590 nm. O resultado foi expresso como unidade relativa de fluorescência.

2.7.4. Produção de citocinas

A avaliação da produção de citocinas nos sobrenadantes das culturas de macrófagos foi realizada por citometria empregando o método *Cytometric Bead Array* (CBA) utilizando-se o *kit inflammation* (IL-1 β , IL-6, IL-10, TNF- α e IL-12P70 – BD Biosciences Pharmigen, CA, EUA) seguindo as recomendações do fabricante.

Os sobrenadantes e os padrões de citocinas do kit, foram adicionados aos tubos de aquisição e incubados com microesferas de captura recobertas com anticorpos específicos para as respectivas citocinas e com o anticorpo de detecção conjugado com o ficoeritrina (PE). As amostras foram incubadas por 3 horas à temperatura ambiente na ausência de luz. O mesmo procedimento foi realizado para obtenção da curva-padrão.

Após o período de incubação, foi adicionado a cada tubo 500 μ l da solução de lavagem e foram centrifugados a 200g por 5 minutos. O sobrenadante foi removido e o “pellet” foi ressuspensionado em 300 μ L de solução de lavagem e as amostras foram adquiridas em citômetro

de fluxo (FACS Canto II). Os resultados foram gerados em gráficos e tabelas utilizando-se o FCAP Array software. Este ensaio foi realizado no laboratório de Imunopatologia do Departamento de Patologia FCM-UERJ.

2.8 Atividade *in vivo* da quercetina

2.8.1. Modelos animais e infecção

Para avaliação *in vivo*, da atividade da quercetina, foram utilizados três modelos experimentais: *Mesocricetus auratus* (hamsters golden) como modelo de infecção para *L. braziliensis* e camundongos BALB/c e C57BL/6 para modelo de suscetibilidade e resistência para *L. major*, respectivamente. Os animais (fêmeas 5-8/grupo) com idade de 60-70 dias foram infectados no dorso da pata traseira direita (hamsters golden) ou no coxim plantar (camundongos) com um inóculo de 10^6 promastigotas de *L. braziliensis* ou *L. major* na fase estacionária.

2.8.2 Tratamento de hamsters infectados com *L. braziliensis*

Em hamsters, foi utilizado dois esquemas terapêuticos (Figura 13). Os animais foram tratados com 20 mg/ kg da quercetina por 5 dias na semana. Os grupos controles foram animais infectados e não-tratados.

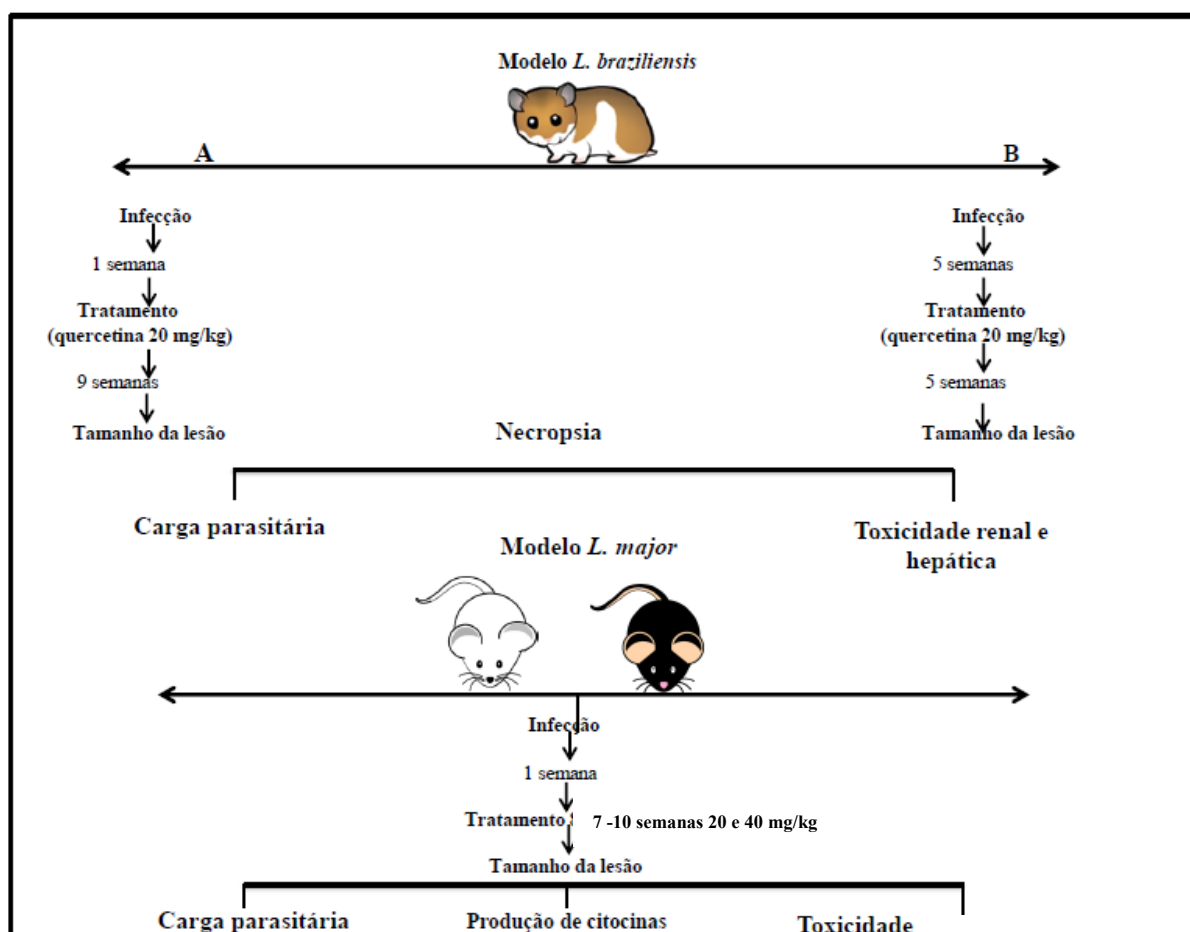
A) O tratamento foi iniciado 1 semana após a infecção e realizado durante 9 semanas. O curso da infecção foi monitorado por medidas semanais da lesão na pata com paquímetro (Mitutoyo, Brasil). O tamanho da lesão foi determinado pela diferença entre os tamanhos da pata infectada e a pata contralateral não infectada e expresso em milímetros (mm)

B) O tratamento foi iniciado após a lesão estabelecida (5 semanas) e realizado durante 5 semanas. O curso da infecção foi monitorado por medidas semanais da lesão na pata com paquímetro (Mitutoyo, Brasil). O tamanho da lesão foi determinado pela diferença entre os tamanhos da pata infectada e a pata contralateral não infectada.

2.8.3 Tratamentos de camundongos BALB/c e C57BL/6.

Em camundongos, foram utilizadas duas doses de quercetina (20mg e 40mg), por gavagem pela via oral. Os grupos controles foram animais infectados e não-tratados o tratamento foi iniciado após o sétimo dia de infecção, foi realizado em um período de 7- 10 semanas. O curso da infecção foi monitorado por medidas semanais da lesão na pata com paquímetro (Mitutoyo, Brasil). O tamanho da lesão foi determinado pela diferença entre os tamanhos da pata infectada e a pata contralateral não infectada.

Figura 13 - Desenho experimental dos esquemas terapêuticos *In vivo*



Legenda: Esquema terapêutico *In vivo* de Hamsters e camundongos infectados e tratados com quercetina. Modelo *L. braziliensis* (A) Hamsters tratados 1 semana após infecção, tratamento durante nove semanas, medidas semanais da pata (B) Hamsters tratados após a lesão estabelecida. Modelo *L. major* tratados 1 semana após infecção com 20 e 40 mg/kg de quercetina. Tratamento por 7- 10 semanas.

Fonte: . A autora, 2017.

2.8.4 Quantificação da carga parasitária

Para determinação da carga parasitária, a região da lesão e o linfonodo drenante foram assepticamente removidos para realização do método da diluição limitante (LIMA; BLEYENBERG; TITUS, 1997). Após a pesagem, os tecidos das patas e dos linfonodos foram macerados sobre peneiras com 5 ml de meio Scheneider, suplementados com 20% de soro fetal bovino, com auxílio de embolo de seringa. Em seguida, 20 μ l da suspensão de células foram diluídos em 180 μ l de meio Scheneider's suplementado com 20% de soro fetal bovino em placa de 96 poços em quadruplicatas. A partir do primeiro poço, foram feitas diluições seriadas (fator de diluição 1:4). As placas foram incubadas a 26°C em estufa BOD e avaliados quanto a presença de promastigotas durante 7- 10 dias. Os resultados foram obtidos a partir da média dos últimos poços onde parasitos viáveis foram observados e dividido pelo peso dos fragmentos e expresso em número de parasitos por grama de tecido.

2.8.5. Avaliação da produção de citocinas

Para a avaliação da produção de citocinas por linfócitos de camundongos BALB/c e C5BL/6, o baço foi retirado e macerado (pool de 3-4 animais/ grupo) em aproximadamente 5 ml de meio RPMI gelado e posteriormente centrifugado em tubo cônico a 4°C/300g/ 10 minutos. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspendido em 1ml de ACK (solução de lise de hemácias). Em seguida, foi adicionado \pm 15 ml de meio de cultura RPMI, centrifugado novamente e o pellet ressuspendido em aproximadamente 5 ml de RPMI gelado. As células foram contadas com azul de tripan e ajustadas para a concentração de 2×10^6 /ml. Em seguida foram plaqueadas em placas de 24 poços e estimuladas ou não com Concanavalina A (5 μ g/ml) durante 72 horas. Após este período, os sobrenadantes foram colhidos e congelados a -20 °C para posterior dosagem de citocinas (Item 6.7.4).

2.8.6 Parâmetros bioquímicos de toxicidade hepática e renal

A coleta de sangue para análise bioquímica foi realizada de acordo com o Manual de Utilização de Animais/ Fiocruz. As amostras de sangue dos animais foram coletadas através de punção cardíaca e incubadas em estufa 37°C para coagular e após 30 minutos foi centrifugada a 300g por 10 minutos para obtenção de soro. Os seguintes parâmetros séricos foram analisados: alanino aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST), para verificar a função hepática. Além do parâmetro creatinina para verificar a função renal.

2.9 Análises estatísticas

Os dados foram analisados pelo teste t de Student ou análise de variância (ANOVA), seguido pelo pós teste de Bonferroni em Graphpad Prism 5 (Graphpad Software, La Jolla, CA, EUA). Os resultados foram considerados significativos quando $p \leq 0,05$.

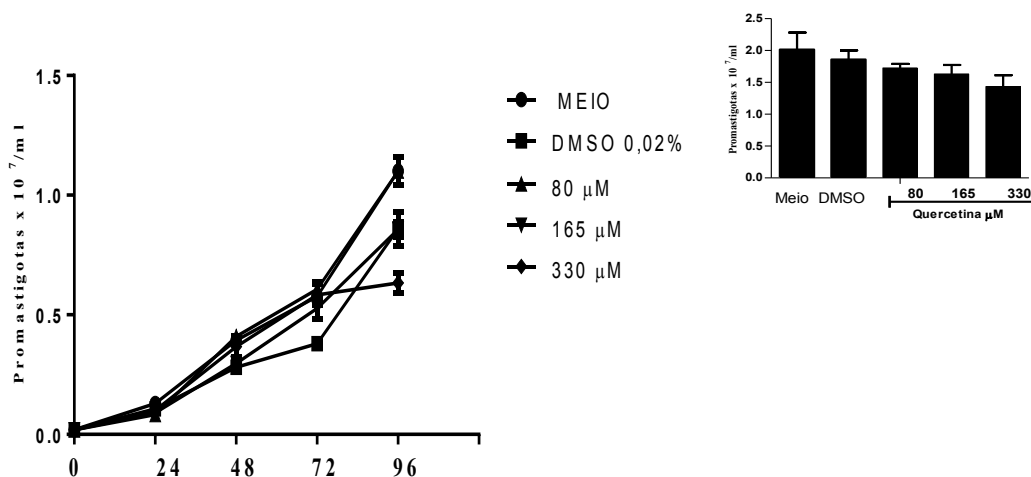
3 RESULTADOS

3.1 Atividade da quercetina no modelo de infecção com *Leishmania braziliensis*

3.1.1. Atividade em promastigotas.

Promastigotas foram incubadas por 96 horas na presença de diferentes concentrações de quercetina. A contagem diária de parasitos mostra que a quercetina não altera o crescimento de promastigotas de *L. braziliensis*, nas concentrações testadas (Figura14).

Figura 14-Atividade sobre o crescimento de formas promastigotasde *L. braziliensis*.



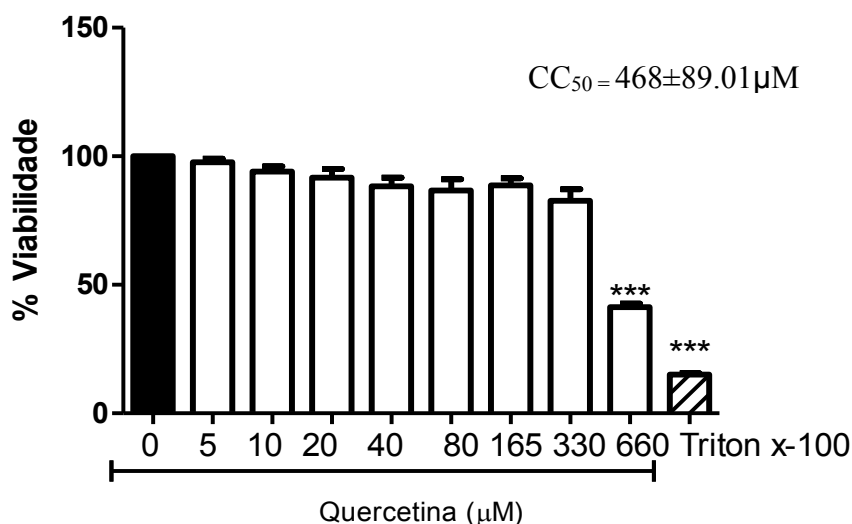
Legenda. Atividade sobre o crescimento de formas promastigotasde *L. braziliensis*. Promastigotas de *L. braziliensis* a 2×10^6 /ml foram distribuídas em triplicatas em placas de 24 poços (0,5ml/poço) e incubadas a 28°C durante 96 horas na presença das concentrações indicadas de quercetina diluídos em meio Schneider's com 20% de soro a 28°C. O inset mostra os dados relativos ao último dia de cultivo. Controles foram parasitos cultivados somente com meio de cultura e soro e DMSO a 0,02%, não havendo diferença significativa entre eles. As células foram contadas diariamente em câmara de Neubauer. O inset mostra o resultado no 4º dia de cultura. (média \pm SD, n=3).

Fonte: . A autora, 2017.

3.1.2. Avaliação da concentração tóxica para macrófagos de hamsters

Antes dos ensaios em amastigotas intracelulares, foi avaliada a concentração tóxica da quercetina para as células do hospedeiro (macrófagos de hamsters). Nas condições testadas, as células apresentaram significativa perda da viabilidade a partir da concentração de 660 μ M. A concentração citotóxica de 50% dos macrófagos (CC₅₀) foi estimada em torno de 468 μ M (Figura 15).

Figura 15-Viabilidade de macrófagos de hamsters tratados com quercetina.



Legenda. Viabilidade de macrófagos de hamsters tratados com quercetina. Monocamadas de macrófagos peritoneais de hamsters foram incubadas com diferentes concentrações da quercetina por 48 horas a 37°C/5% CO₂. Após o tratamento, as células foram incubadas com MTT por 3 horas a 37°C/5% CO₂ e 100 μ l de DMSO foi utilizado para a solubilização dos cristais de Formazan. O controle positivo para redução da viabilidade foi obtido utilizando 0,1% triton x-100. A absorbância foi mensurada a 570nm. O resultado expresso como percentual de viabilidade em relação ao controle. (média \pm SD, n=3). *** p<0,001.

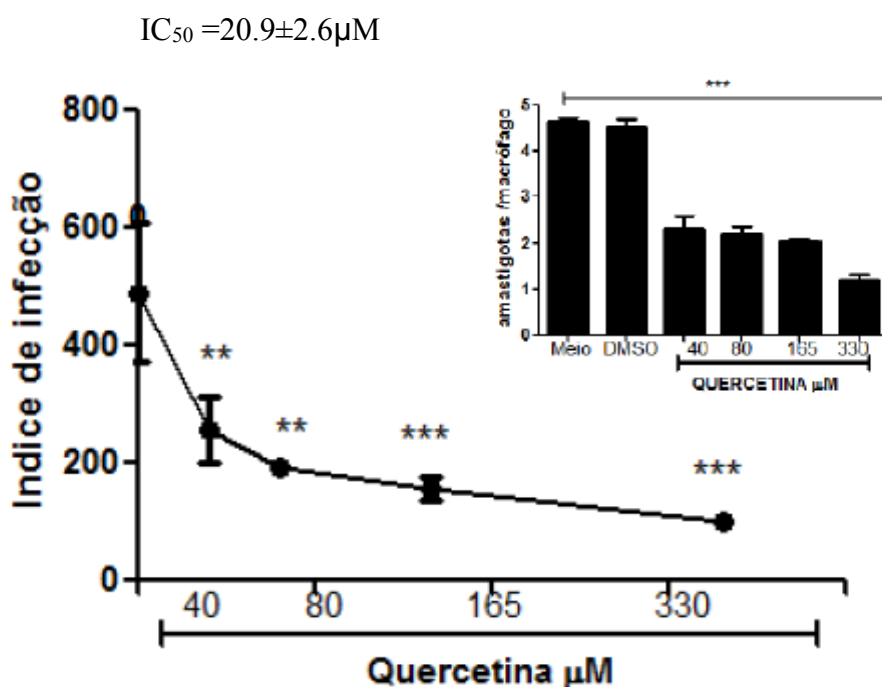
Fonte: A autora, 2017.

3.1.3 Atividade anti-amastigota e índice de seletividade

Para avaliar a atividade da quercetina sobre amastigotas intracelulares, monocamadas de macrófagos peritoneais de hamsters foram infectadas com *L. braziliensis* e tratadas por 48 horas.

Nas concentrações de 40, 80, 165 e 330 μM , a quercetina inibiu, respectivamente 54%, 63%, 69% e 79% o índice de infecção. A concentração inibitória para 50% dos parasitos (IC_{50}) foi estimada em $20.9 \pm 2.6 \mu\text{M}$ (Figura 16). O inset mostra o gráfico de número de amastigotas/ macrófago. O índice de seletividade foi calculado em 22, sendo 22 vezes mais tóxico para *L. braziliensis* do que para macrófagos de hamsters (Tabela 6).

Figura 16. Atividade anti-amastigota da quercetina



Legenda: Atividade anti-amastigota da quercetina. Monocamadas de macrófagos de hamsters foram infectadas na proporção de 5:1 por 4 horas e submetidas ao tratamento com quercetina nas concentrações indicadas por 48h a $37^{\circ}\text{C}/5\% \text{CO}_2$. Controles foram macrófagos infectados cultivados somente com meio de cultura e soro e DMSO a 0,02%, não havendo diferença significativa entre eles. Após o tratamento as monocamadas foram coradas e o índice de infecção foi estabelecido pela contagem de pelo menos 100 macrófagos por lamínula em microscopia ótica. O inset mostra o gráfico do número de amastigotas por macrófago (média \pm SD, n=3). ** $p < 0,01$ e *** $p < 0,001$.

Fonte: A autora, 2017.

Tabela 6. Índice de seletividade da quercetina em macrófagos de hamsters infectados com *L. braziliensis*

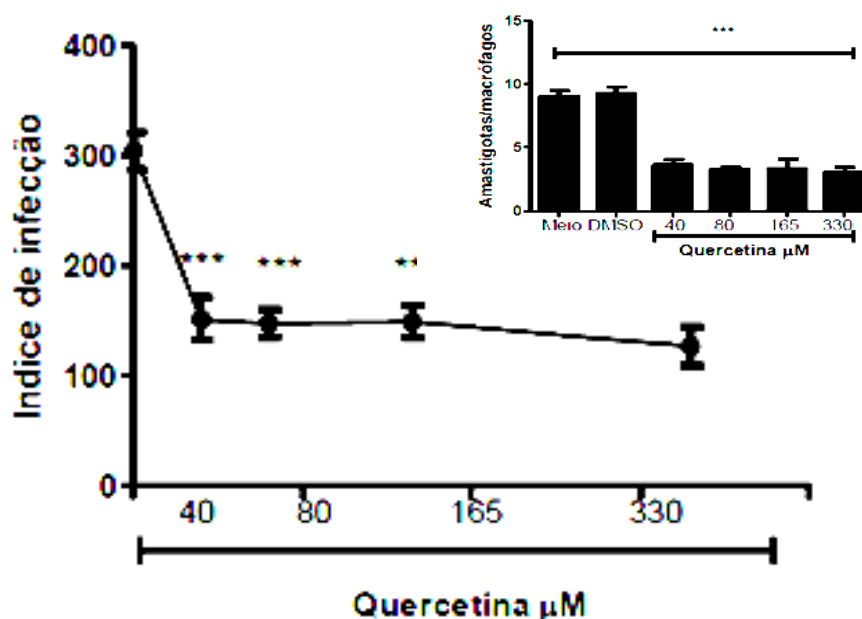
IC 50 amastigota	CC50 macrófagos	Índice de seletividade
20.9 μ M	468 μ M	22

Fonte: A autora, 2017

3.1.4. Avaliação da atividade antiamastigota da quercetina em macrófagos de hamster tratados antes da infecção.

Com o objetivo de avaliar se a quercetina agiria sobre a células hospedeira, modulando sua ação microbicida, as monocamadas de macrófagos de hamsters foram tratadas por 24 horas antes da infecção com *L. braziliensis*. O tratamento prévio dos macrófagos com a quercetina reduziu o índice de infecção em 56%, 60%, 64% e 65%, nas concentrações de 40, 80, 165 e 330 μ M, respectivamente (Figura 17). O *inset* mostra o número de amastigotas por macrófago.

Figura 17-Atividade anti-amastigota em macrófagos de hamster pré- tratados com a quercetina



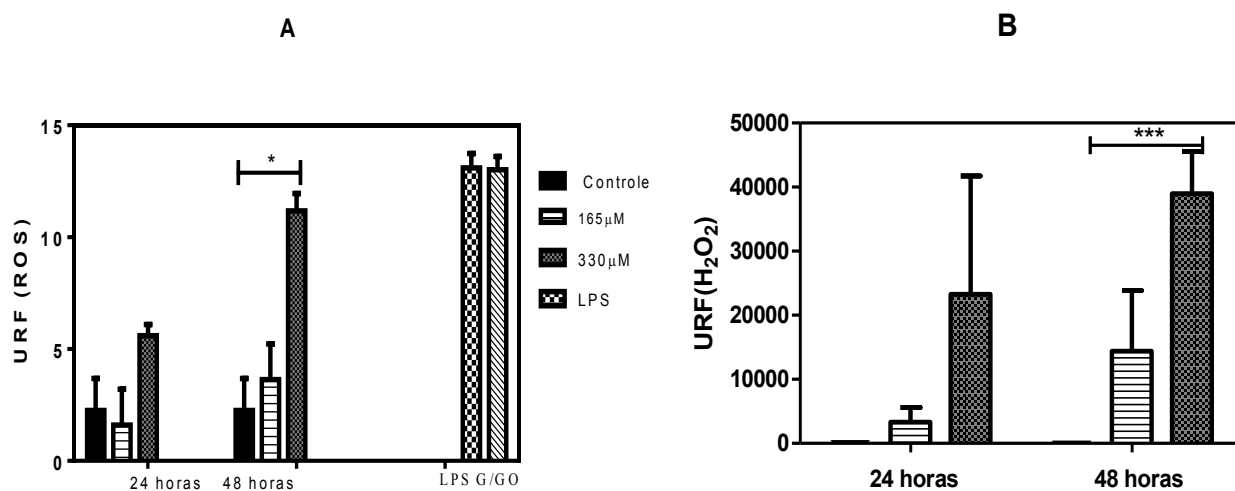
Legenda: Atividade anti-amastigota em macrófagos de hamster pré- tratados com a quercetina. Monocamadas de macrófagos peritoneais de hamsters foram tratadas por 24 horas com quercetina, lavadas e infectadas com *L. braziliensis* na proporção de 5:1 por 4 horas. Controles foram macrófagos infectados cultivados somente com meio de cultura, soro e DMSO a 0,02%. Após infecção, as células foram incubadas com meio de cultura RPMI e soro fetal bovino por 24h a 37°C/5% CO₂. Após esse período as lâminas foram coradas com panótico e o índice de infecção foi estabelecido pela contagem de pelo menos 100 macrófagos por microscopia ótica. O inset mostra o gráfico de número de amastigotas/ macrófago (média ±SD, n=3)***p < 0,001.

Fonte: A autora, 2017

3.1.5. Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio intracelular em macrófagos

Como foi observado que o tratamento prévio dos macrófagos de hamsters foi capaz de reduzir o índice de infecção, foi avaliado se a quercetina seria capaz de induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) pela célula hospedeira. Para isso foram utilizadas as sondas H₂DCDFDA e *AmplexRed* em dois sistemas: macrófagos tratados por 24 e 48 horas sem infecção e macrófagos tratados por 48 horas após a infecção. Os macrófagos sem infecção, tratados por 24 horas e 48 horas, mostraram um aumento da produção ROS (Figura 18A), sendo estatisticamente significativo em 48 horas, com 330 μM da quercetina. A avaliação com a sonda *Amplex red*, mostrou que houve aumento de H₂O₂, sobretudo com 48 h de tratamento (Figura 18B).

Figura 18-Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos de hamsters tratados com a quercetina sem infecção

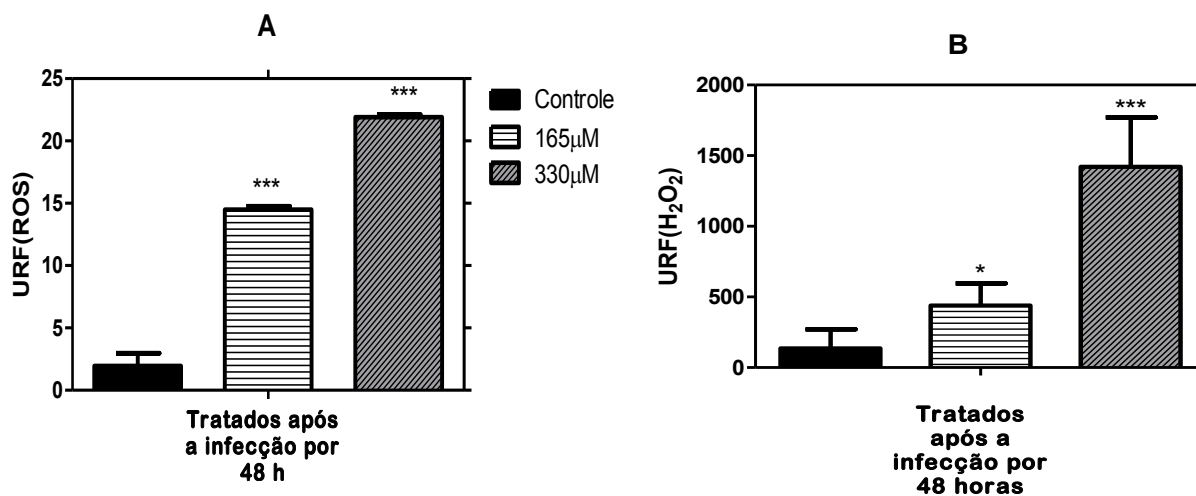


Legenda: Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos de hamsters tratados com a quercetina sem infecção. As monocamadas de macrófagos foram submetidos ao tratamento com a quercetina por 24 e 48 horas. Após este período, os macrófagos foram incubados com a sonda H₂DCDFDA(A) ou *amplex red* (B) por 30 minutos. A leitura foi feita em fluorímetro. (média ±SD, n=3)URF = Unidade relativa de fluorescência; G/GO =glucose/glucose oxidase. *p<0,05, *** p<0,001.

Fonte: A autora, 2017.

O tratamento por 48 horas após a infecção aumentou significativamente a produção de ROS e H₂O₂ de maneira dose-dependente (Figura 19 Ae 19B).

Figura 19-Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos de hamsters infectados e tratados com a quercetina



Legenda: Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio em macrófagos de hamsters infectados e tratados com a quercetina. As monocamadas de macrófagos foram submetidos ao tratamento após a infecção por 48 horas e incubados com a sonda H₂DCDFDA(A) ou *Amplexred* (B) por 30 minutos a 37°C/5% CO₂, foi feita a leitura em fluorímetro. Controles foram macrófagos infectados somente com meio de cultura (média ±SD, n=3) URF= Unidade Relativa de fluorescência. *p<0,05, ***p < 0,001.

Fonte: A autora, 2017

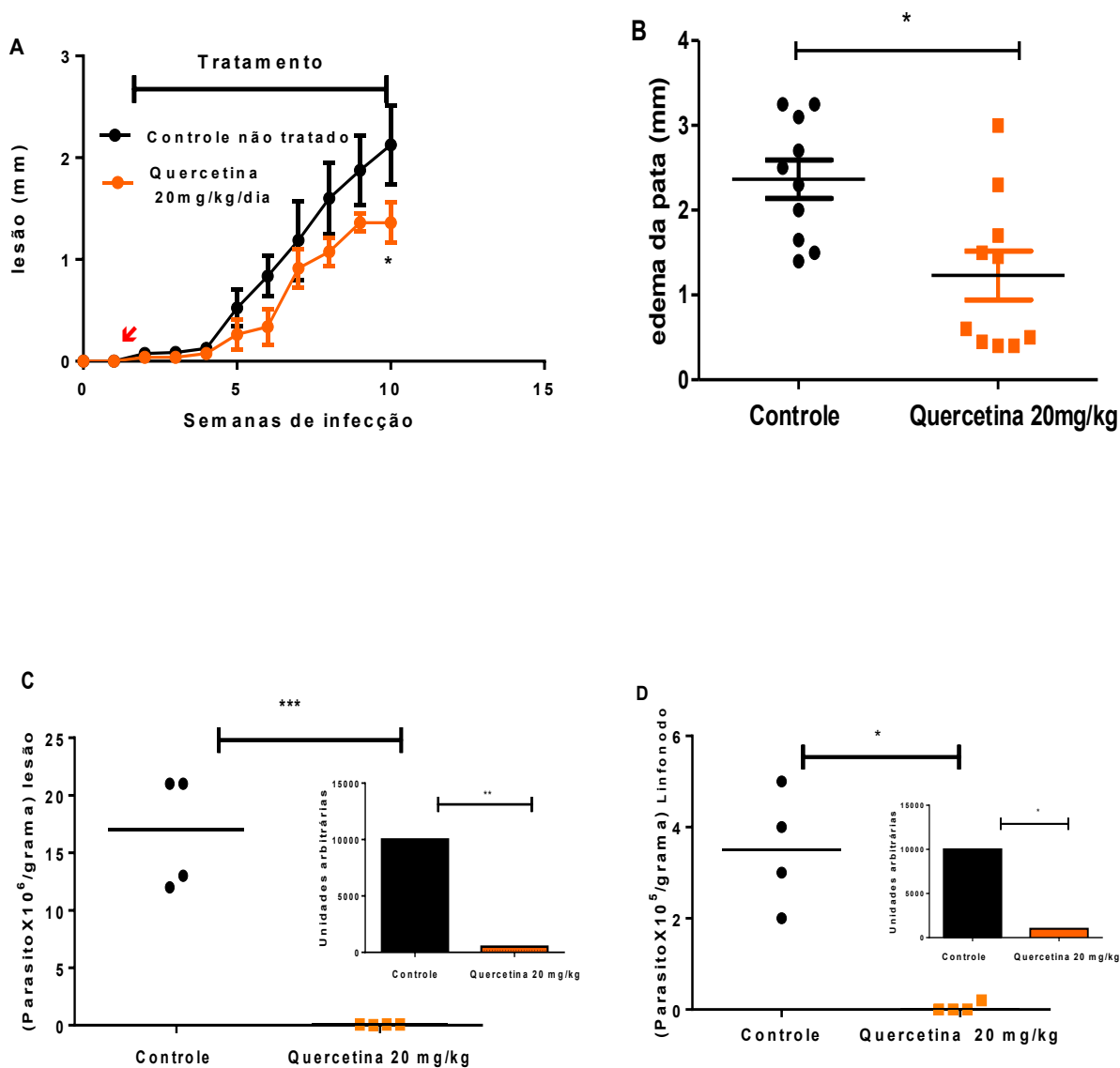
3.2. Atividade *in vivo* da quercetina no modelo hamster (*Mesocricetus auratus*)

3.2.1 Tratamento após 7 dias de infecção

Utilizando o modelo experimental suscetível para infecção com *L. braziliensis*, o hamster dourado (*Mesocricetus auratus*), avaliamos a ação da quercetina administrada pela via oral (20 mg/kg). Os animais foram infectados (n=5) com 1x10⁶ de promastigotas de *L. braziliensis* e o tratamento foi iniciado após 7 dias de infecção. Foi administrado 20 mg/kg (5 x na semana), durante 9 semanas. Os resultados mostraram que houve redução no tamanho das lesões, estatisticamente significativo (Figura 20 A e B), nove semanas após o início do tratamento e houve redução na carga parasitária, tanto na lesão (Figura 20C) quanto no linfonodo drenante (Figura 20D).

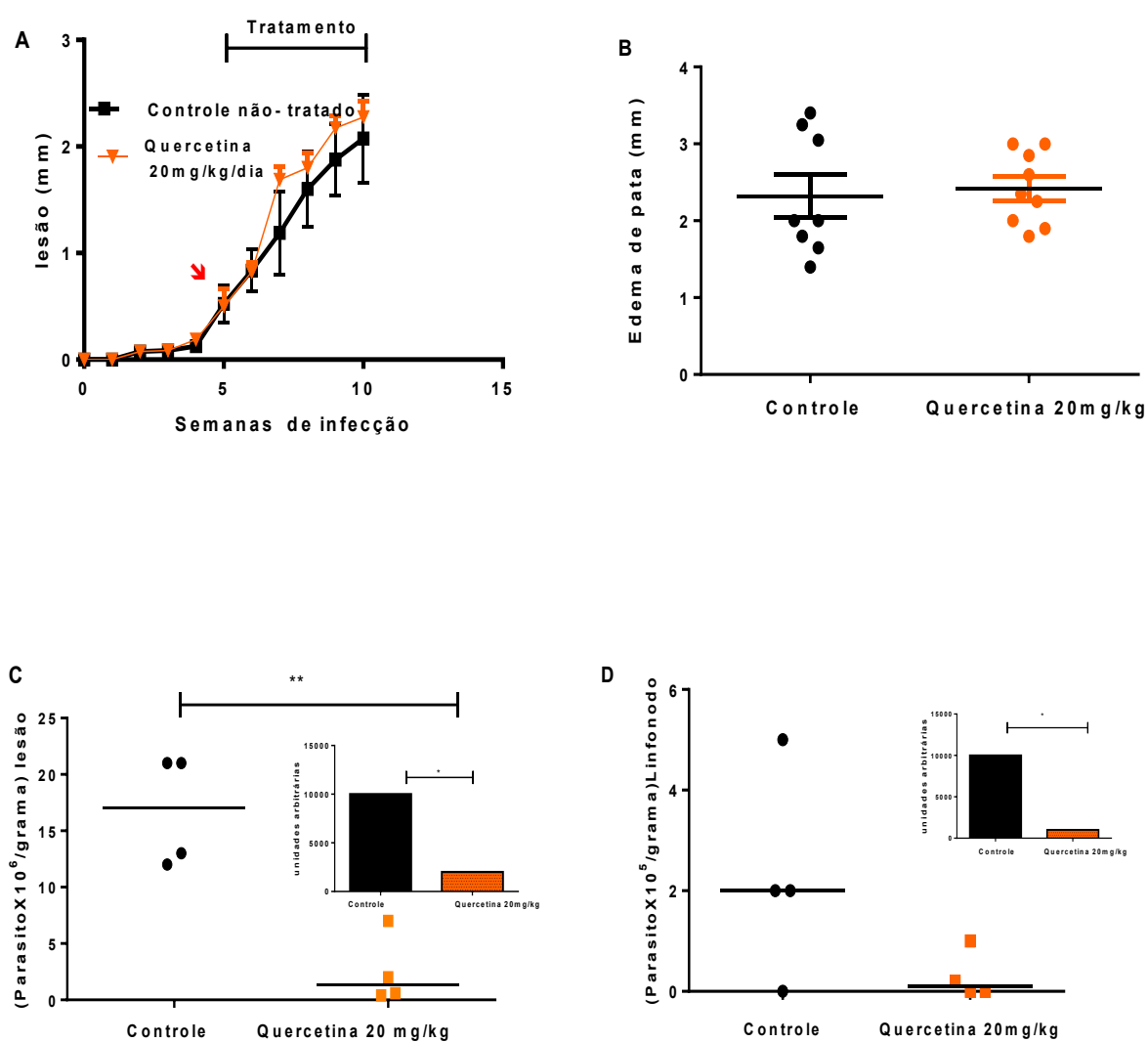
Parâmetros bioquímicos hepáticos de toxicidade como alanino aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e renal, como creatinina foram avaliados. ALT, AST e creatinina não foram alterados nos animais tratados com a quercetina (Figura 20E, 20F e 20G), segundo os valores de referência.

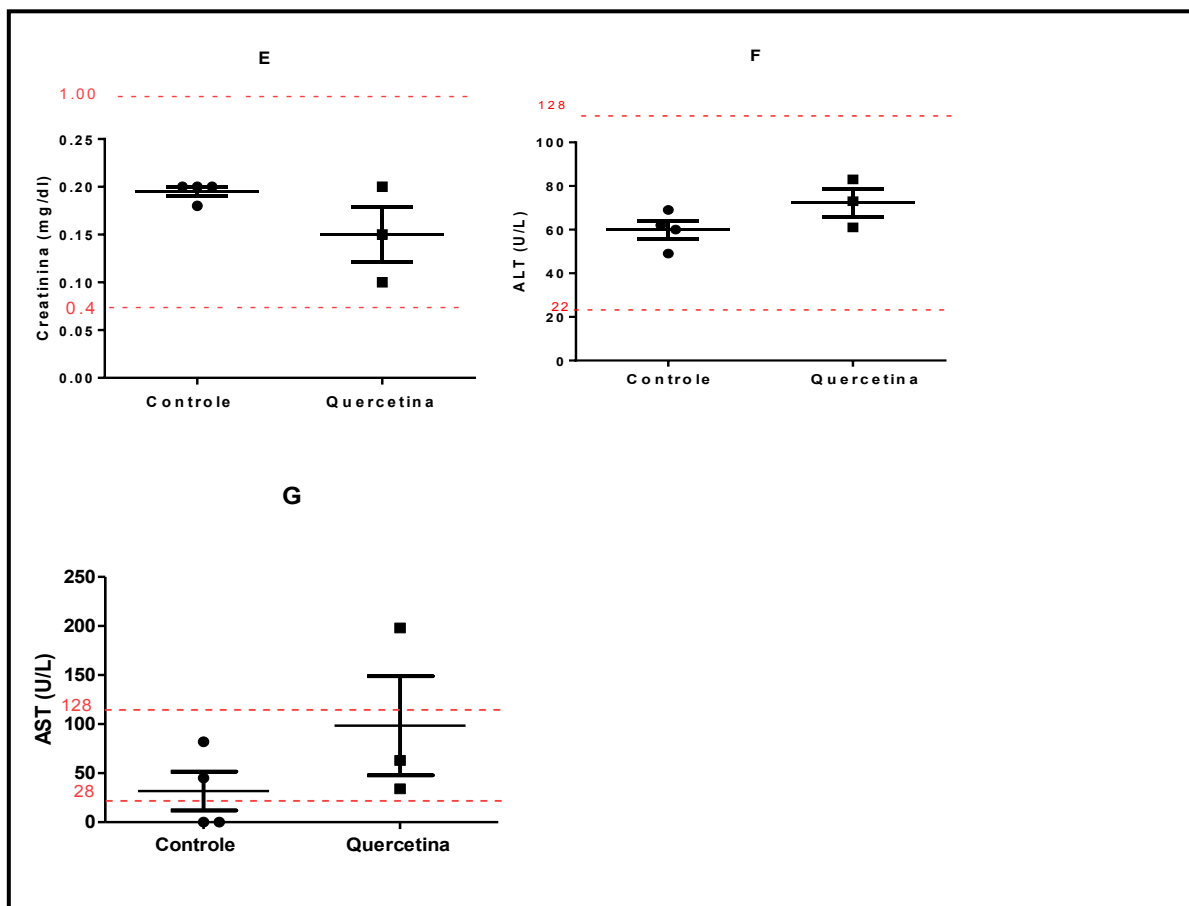
Figura 20-Efeito do tratamento oral com quercetina em hamsters infectados com *Leishmania braziliensis*



(Figura 21 C e D). Parâmetros bioquímicos de toxicidade da função hepática como alanino aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) e renal como creatinina foram avaliados. ALT, AST e creatinina não foram alterados nos animais tratados com a quercetina (Figura 21E, 21F e 21G), segundo os valores de referência.

Figura 21-Efeito do tratamento oral com quercetina em hamsters infectados com *L.braziliensis* após lesão estabelecida.





Legenda: Efeito do tratamento oral com quercetina em hamsters infectados com *L.braziliensis* após lesão estabelecida. Hamsters golden (5 animais/grupo) foram infectados na pata com *L. braziliensis* e tratados após o estabelecimento da lesão 5x semana com 20 mg/kg com quercetina. Controles foram animais não tratados. Em (A) o tamanho das lesões (média \pm SEM). A seta indica o início do tratamento. Em (B) Edema da lesão 9 semanas após a infecção. Cada ponto representa um animal de 2 experimentos independentes. (C) carga parasitária da pata expresso em parasito/mg de tecido n=4. O inset representa um experimento independente expresso em unidades arbitrarias n=5 (D) Carga parasitária do linfonodo relativo a 1 experimento n=4. O inset representa um experimento independente expresso em unidades arbitrarias n=5. (E-G) Avaliação sérica de parâmetros bioquímicas (E) creatinina (F) Alanina aminotransferase (ALT) (G) Aspartato aminotransferase (AST). As linhas tracejadas indicam os valores mínimos e máximo de referência do CECAL- Fiocruz * p<0,05, **p<0,01.

Fonte: A autora, 2017

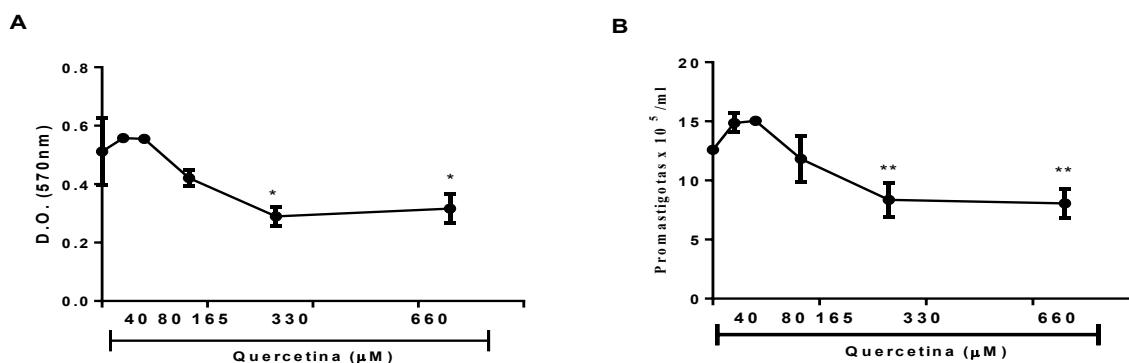
3.3. Atividade da quercetina no modelo de infecção com *L. major*

Para permitir explorar a atividade antiparasitária da quercetina em outra espécie de *Leishmania* e também avaliar um possível efeito imunomodulador da quercetina, foi utilizado o modelo de infecção com *L. major*.

3.3.1. Atividade em promastigotas

Para a avaliação da atividade da quercetina sobre as formas promastigotas de *L. major*, os parasitos foram incubados por 96 horas com diferentes concentrações da quercetina. Houve diminuição na proliferação (Figura 22B) e na viabilidade dos parasitos (Figura 22A), a partir das concentrações de e 330 μ M inibindo até 66% o crescimento de promastigotas com 330 μ M (Figura 22A e B).

Figura 22-Atividade da quercetina sobre formas promastigotas de *L. major*



Legenda. Atividade da quercetina sobre formas promastigotas de *L. major*. Promastigotas de *L. major* a 2×10^6 /ml foram distribuídas em triplicatas em placas de 24 poços (0,5ml/poço) e incubadas a 28°C durante 96 horas na presença das concentrações indicadas de quercetina em meio Schneider's com 20% de soro a 28°C. Controles foram parasitos cultivados somente com meio de cultura e soro e DMSO a 0,02%. As células foram contadas em câmara de Neubauer, no último dia de cultura (B) ou incubadas por 3 horas com o reagente MTT, nas últimas horas de cultivo (A) e o resultado mostrado no 4º dia de cultura. (média \pm SD, n=3). *p<0,05, ** p<0,01.

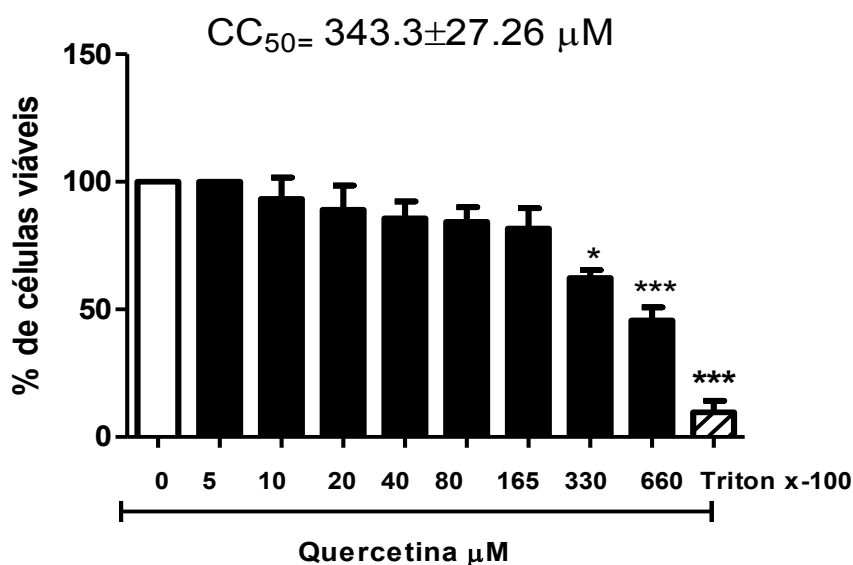
Fonte: A autora, 2017.

3.3.2. Avaliação da toxicidade em macrófagos de camundongos BALB/c

Com o propósito de avaliar a toxicidade da quercetina sobre células de camundongos BALB/c, uma monocamada de macrófagos peritoneais foi incubada com diferentes concentrações da quercetina de por 48 horas. Após o tempo de tratamento, a viabilidade foi

avaliada através do reagente MTT. As células apresentaram perda da viabilidade celular a partir da concentração de 330 μ M de quercetina (Figura 23) A concentração citotóxica para 50% dos macrófagos (CC₅₀) foi estimada em torno de 343 μ M.

Figura 23-Viabilidade celular de macrófagos de camundongos BALB/c tratados com quercetina



Legenda: Viabilidade celular de macrófagos de camundongos BALB/c tratados com quercetina. Monocamadas de macrófagos de camundongos BALB/c foram incubadas com diferentes concentrações da quercetina, variando de 0- 660 μ M por 48 horas a 37°C/5% CO₂. Após o tratamento as células foram incubadas por 3 horas com MTT a 37°C/5% CO₂. O controle positivo para redução da viabilidade foi obtido utilizando 0,1% triton x-100. A absorbância foi mensurada a 570nm. (média \pm SD, n=3). O resultado expresso como percentual da viabilidade em relação ao controle. ***p<0,001 * p<0,05.

Fonte: A autora, 2017

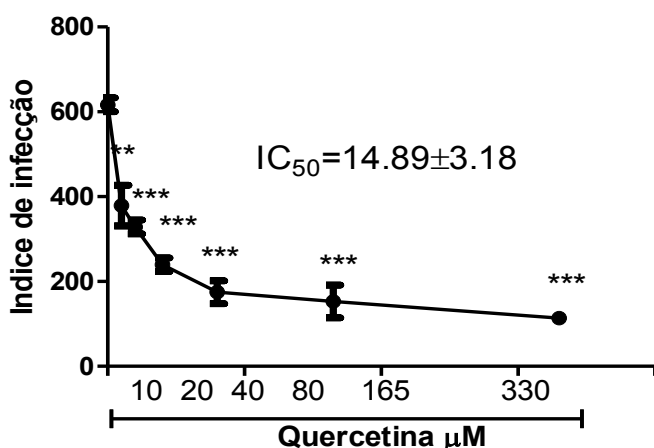
3.3.3 Atividade anti-amastigota

3.3.3.1 Determinação da IC50

Para avaliar a atividade da quercetina sobre amastigotas intracelulares de *L. major*, monocamadas de macrófagos peritoneais de BALB/c foram infectadas por *L. major* e tratadas com diversas concentrações da quercetina por 48 horas. A quercetina foi capaz de diminuir o

índice de infecção em 48%, 53%, 62%, 72%, 75% e 81%, nas concentrações de 10, 20, 40, 80, 165 e 330 μM , respectivamente. A IC 50 foi estimada em 14 μM (Figura 24) O índice de seletividade (IS) foi calculado em 23, sendo 23 vezes mais tóxica para *Leishmania major* do que para macrófagos de camundongos BALB/c (Tabela 7).

Figura 24- Atividade anti-amastigota da quercetina em *L. major*



Legenda: Atividade anti-amastigota da quercetina em *L. major*. Uma monocamada de macrófagos de camundongos BALB/c foi infectada na proporção de 5:1 por 4 horas e submetidas ao tratamento com as concentrações indicadas da quercetina por 48h a 37°C/5% CO₂. Após o tratamento as lâminas foram coradas e o índice de infecção foi estabelecido pela contagem de pelo menos 100 macrófagos por microscopia ótica. (média \pm SD, n=3). ** p<0,01 e ***p<0,001.

Fonte: A autora, 2017

Tabela 7. Índice de seletividade da quercetina em macrófagos de camundongos BALB/c infectados com *L. major*

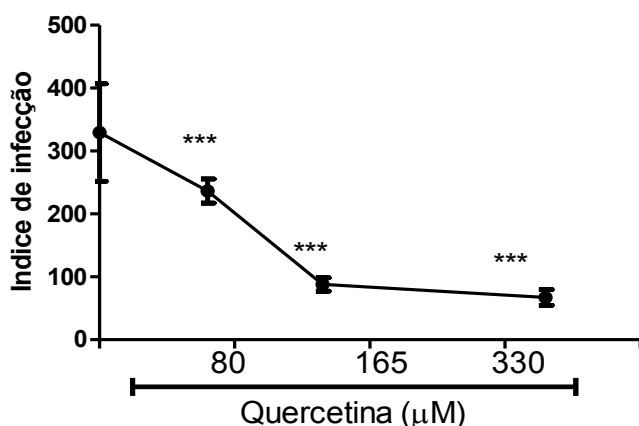
IC50 amastigota	CC50 macrófagos	Índice de seletividade
14.89 μM	343.3 μM	23

Fonte: A autora, 2017

3.3.4 Avaliação da atividade anti-mastigota da quercetina em macrófagos de camundongos BALB/c tratados por 24 horas antes da infecção.

Com a intenção de verificar se a quercetina modularia a atividade microbicida da célula hospedeira, monocamadas de macrófagos de camundongos BALB/c foram tratadas por 24 horas antes da infecção por *L.major*. O tratamento prévio dos macrófagos com a quercetina reduziu o índice de infecção em 47%, 76% e 82% nas concentrações de 80, 165 e 330 μM , respectivamente (Figura 25).

Figura 25 - Avaliação da atividade anti-mastigota da quercetina em macrófagos de camundongos BALB/c tratados por 24 horas antes da infecção.



Legenda: Avaliação da atividade anti-mastigota da quercetina em macrófagos de camundongos BALB/c tratados por 24 horas antes da infecção. Uma monocamada de macrófagos de camundongos BALB/c foi tratada com diferentes concentrações da quercetina por 24 horas, após esse período, a quercetina foi retirada dos poços e a monocamada de células foi incubada por 24 horas com meio de cultura para retirada de resíduos da quercetina e posteriormente infectada na proporção de 5:1 por 4 horas a 37°C/5% CO₂. Após infecção, as células foram incubadas com meio de cultura RPMI e soro fetal bovino por 48h a 37°C/5% CO₂. Após, as lâminas foram coradas e o índice de infecção foi estabelecido pela contagem de pelo menos 100 macrófagos por lâmina. (média \pm SD, n=3). ** p<0,01 e ***p<0,001.

Fonte: A autora, 2017.

3.3.5 Avaliação da produção de citocinas por macrófagos de camundongos BALB/c infectados com *L. major*

Nos sobrenadantes de macrófagos infectados e tratados com a quercetina por 48 horas após a infecção, foi avaliada a produção de citocinas. Nos macrófagos tratados com a quercetina, houve redução dos níveis das citocinas pro-inflamatórias IL-6 e TNF(p<0,001) enquanto houve aumento nos níveis da citocina anti-inflamatória IL-10 (p<0,001) (Figura 26). Os níveis de MCP-1 aumentaram com 165µM de quercetina (p<0,001).

Figura 26-Avaliação da produção de citocinas nos sobrenadantes de macrófagos de camundongos BALB/c infectados com *L. major* e tratados com a quercetina.

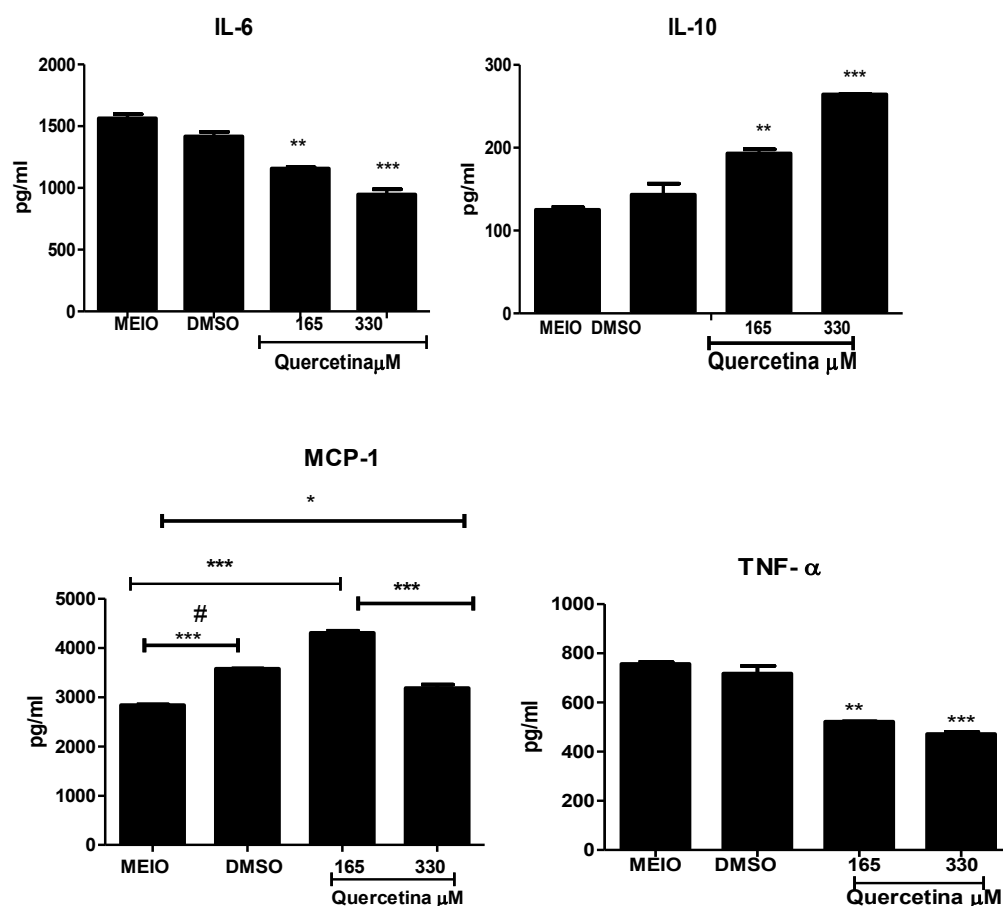


Figura 26. Avaliação da produção de citocinas nos sobrenadantes de macrófagos de camundongos BALB/c infectados com *L. major* e tratados com a quercetina. Uma monocamada de macrófagos de camundongos BALB/c foi infectada na proporção de 5:1 por 4 horas e submetidas ao tratamento com as concentrações de quercetina por 48h a 37°C/5% CO₂. Após esse período, o sobrenadante foi retirado e coletado para avaliação da produção de citocinas, realizada pelo método Cytometric Bead Array (CBA). *p<0,05, **p<0,01, ***p<0,001. Comparação em relação ao controle com meio de cultura. # diferença significativa entre os controles (Meio x DMSO).

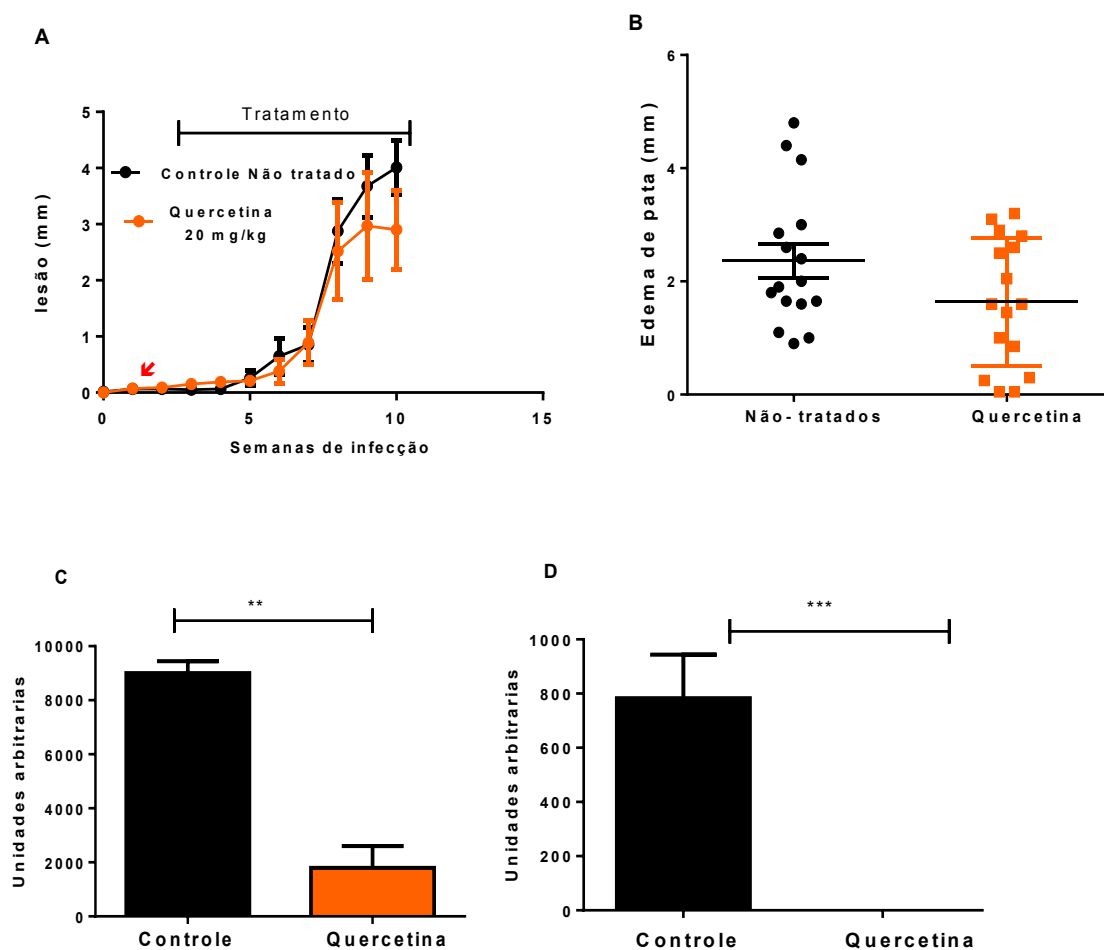
Fonte: A autora, 2017.

3.4. Atividade *in vivo* da quercetina em camundongos BALB/c infectados com *L. major*

3.4.1. Tamanho de lesão e carga parasitária

Utilizando o modelo suscetível para *Leishmania major*, camundongo BALB/c, avaliamos a ação da quercetina administrada pela via oral com 20 mg/kg a partir de 7 dias de infecção durante 9 semanas. Nos animais tratados, foi observado uma pequena diminuição no tamanho das lesões, não significativo estatisticamente (Figura 27A e B). Entretanto, houve uma redução significativa da carga parasitária, tanto na lesão, quanto no linfonodo drenante (Figura 27 C e D).

Figura 27-Efeito do tratamento oral com quercetina a 20 mg/ kg em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania major*

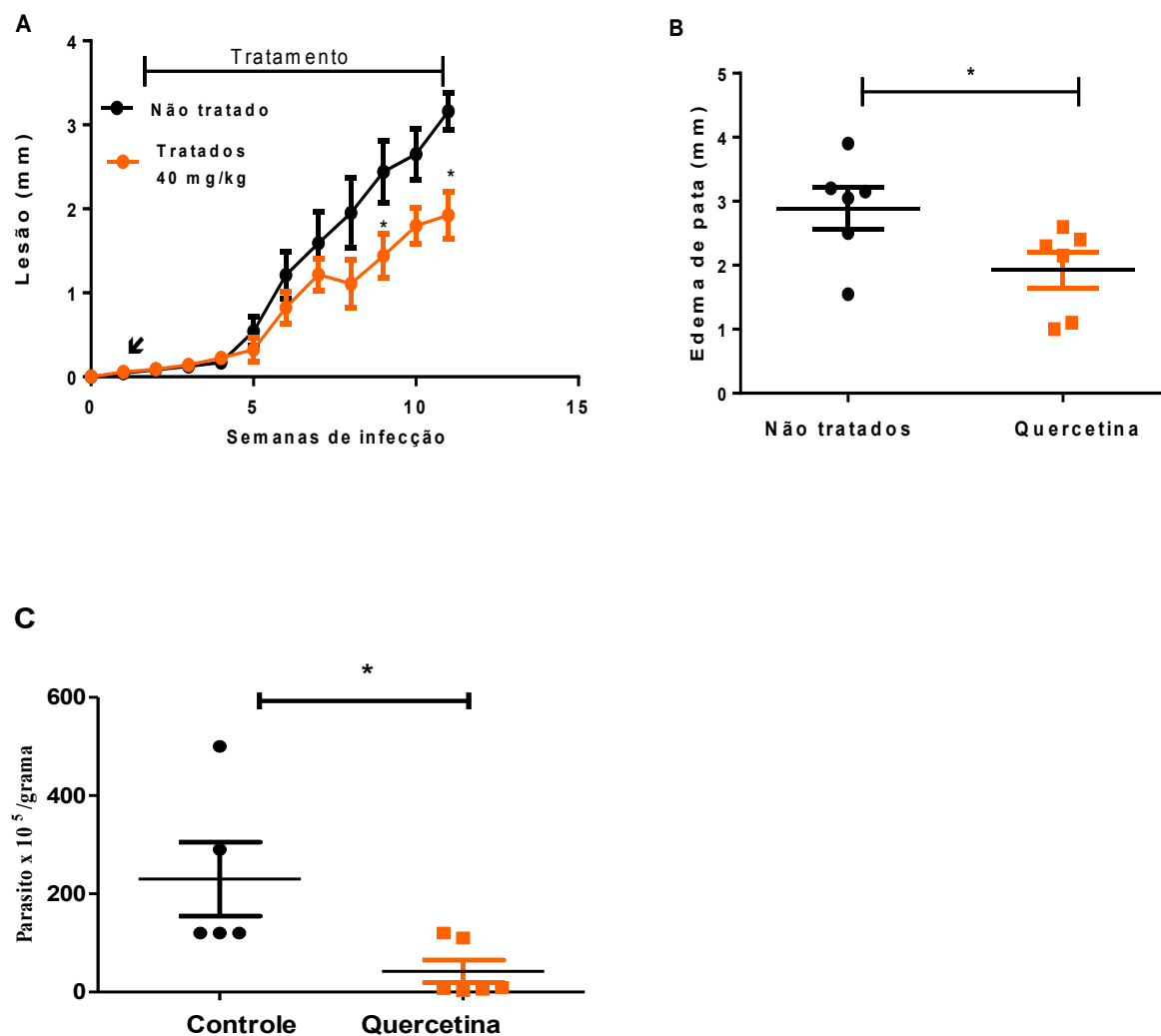


Legenda: Efeito do tratamento oral com quercetina a 20 mg/ kg em camundongos BALB/c infectados com *Leishmania major*. Camundongos BALB/c (5 animais/grupo) foram infectados na pata com *L. major* e tratados a partir do sétimo dia de infecção durante nove semanas. Controles foram animais não tratados. Em (A) o tamanho das lesões foi monitorado por medidas semanais com paquímetro (média \pm SEM). A seta indica o início do tratamento (B) tamanho final da lesão 9 semanas após a infecção. Cada ponto representa um animal. Gráfico relativo a 4 experimentos independentes. (C) carga parasitária da pata (D) carga parasitária do linfonodo drenante. Expresso em unidades arbitrárias. ** $p < 0,01$, *** $p < 0,001$.

Fonte: A autora, 2017.

Em outro experimento, a dose da quercetina administrada foi aumentada para 40 mg/kg e o tempo de tratamento foi aumentado para 10 semanas. Na 11ª semana de infecção, observamos que o grupo tratado com a quercetina, foi capaz de reduzir significativamente o tamanho da lesão (Figura 28A e B) e a carga parasitária da lesão (Figura 28C). A figura 29 mostra fotografias dos animais, onde pode-se observar que o edema das patas no grupo tratado com a quercetina é menor (Figura 29B) do que nos animais do grupo controle não- tratado (Figura 29A).

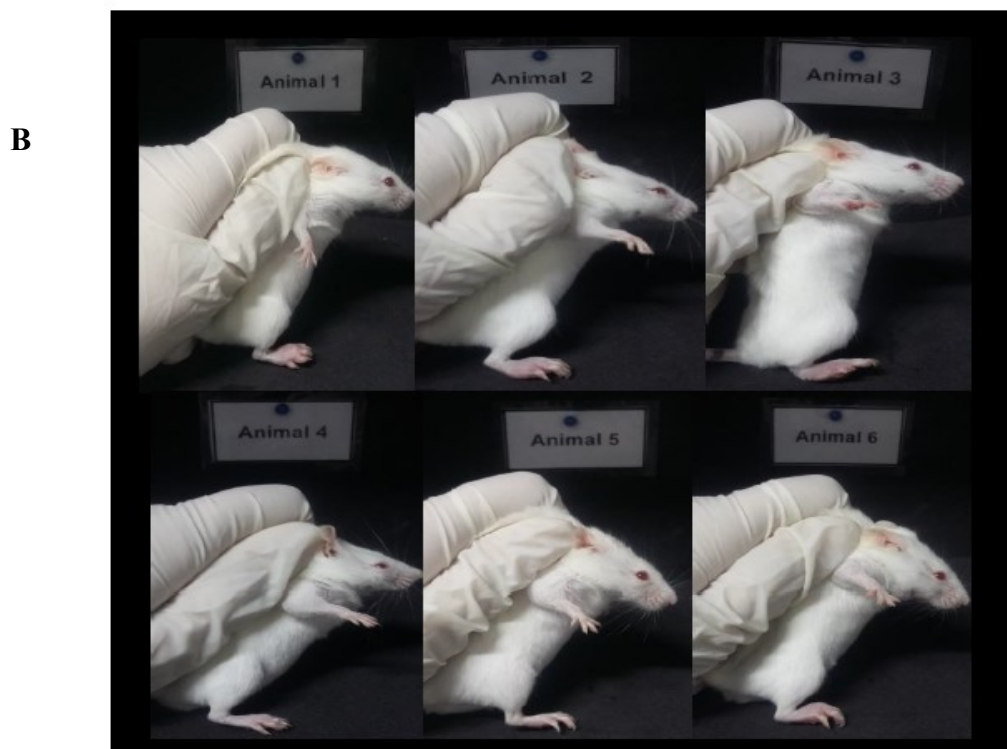
Figura 28 - Efeito do tratamento oral com quercetina (40mg/kg) em camundongos BALB/c infectados com *L. major*.



Legenda: Efeito do tratamento oral com quercetina (40mg/kg) em camundongos BALB/c infectados com *L. major*. Camundongos BALB/c (5 animais/grupo) foram infectados na pata com *L. major* e tratados a partir do sétimo dia de infecção durante dez semanas. Controles foram animais não tratados. Em (A) o tamanho das lesões foi monitorado por medidas semanais com paquímetro (média \pm SEM). A seta indica o início do tratamento em (B) tamanho final da lesão 10 semanas após a infecção. Cada ponto representa um animal. (C) carga parasitária da pata. Expresso em parasito/g tecido. * $p < 0,05$.

Fonte: A autora, 2017.

Figura 29– Fotografia de camundongos BALB/c infectados na pata traseira com *L. major*.



Legenda: Fotografia de camundongos BALB/ c infectados com *L. major* na pata traseira, mostrando o edema de pata na 11ª semana de infecção. Em (A) grupo controle não- tratado. (B) Grupo tratado com a quercetina.

Fonte: A autora, 2017.

3.4.2. Produção de citocinas por linfócitos de camundongos BALB/ c infectados e tratados com quercetina 40mg/kg.

Para avaliar se a quercetina apresentaria atividade imunomoduladora, foi realizada a análise de produção de citocinas por linfócitos de camundongos após 10 semanas de tratamento com 40 mg/ kg da quercetina. Os resultados mostraram que nos linfócitos estimulados com o mitógeno (ConA), houve um aumento significativo das citocinas IL-2, IL-4 e IL-6 (Figura 30A, B e C) no grupo de animais tratados com a quercetina, quando comparado ao controle. Não houve alteração das citocinas IL-10, IL-17A, IFN γ e TNF (Figura 30 D-G) Não houve alteração na produção de citocinas pelas células sem estímulo mitogênico.

Figura 30- Produção de citocinas por linfócitos de camundongos BALB/c infectados e tratados com a quercetina (Continua)

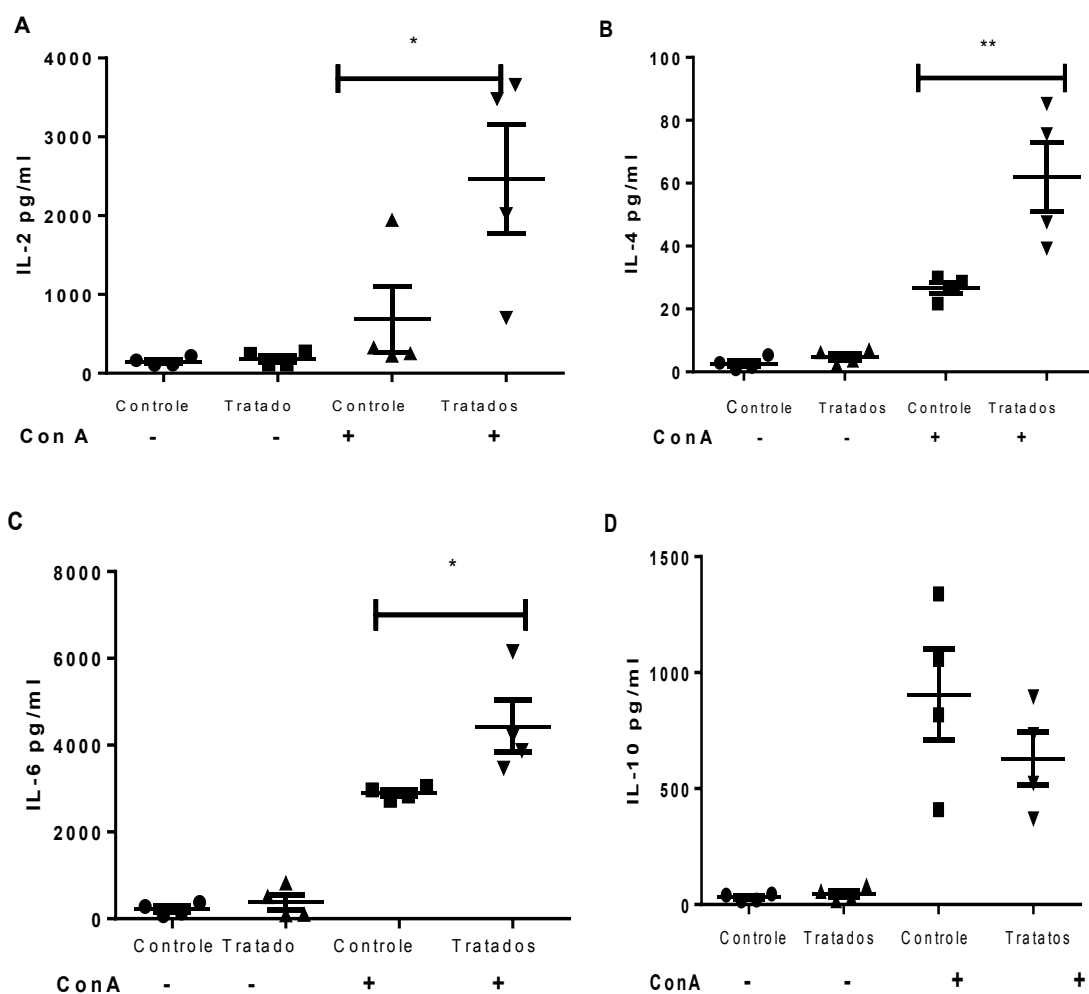
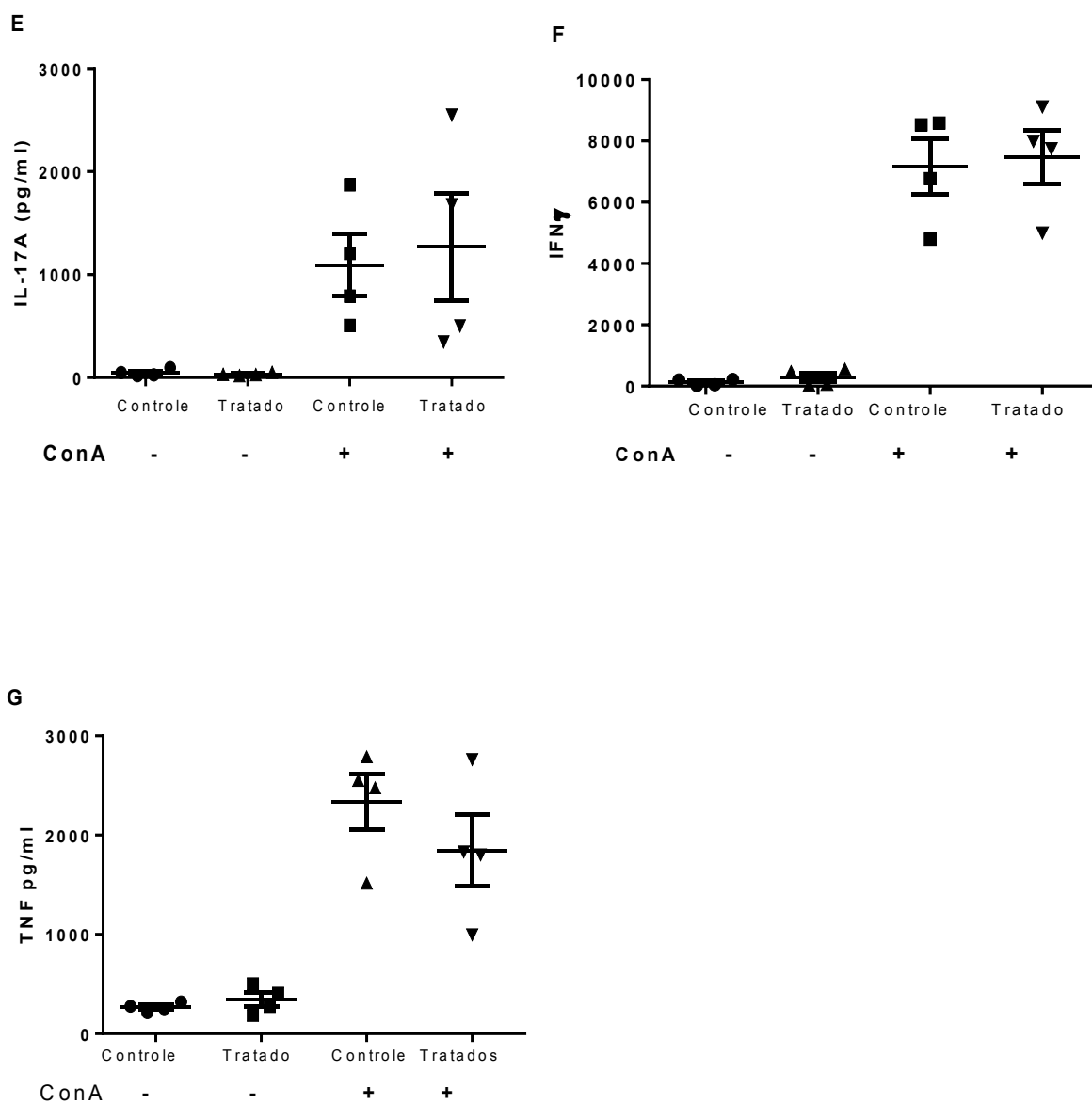


Figura 30- Produção de citocinas por linfócitos de camundongos BALB/c infectados e tratados com a quercetina (Conclusão)



Legenda: Produção de citocinas por linfócitos de camundongos BALB/c infectados e tratados com a quercetina. Os camundongos BALB/c infectados com *L. major* foram tratados ou não com quercetina a partir do sétimo dia de infecção. Ao final do experimento, as células do baço foram plaqueadas 2×10^6 /ml e foram estimuladas ou não com a concanavalina A (ConA) durante 72 horas. Os sobrenadantes foram coletados e foi feita a avaliação da produção de citocinas pelo método Cytometric Bead Array (CBA) e a análise feita por citometria de fluxo. * $p < 0,05$, ** $P < 0,01$.

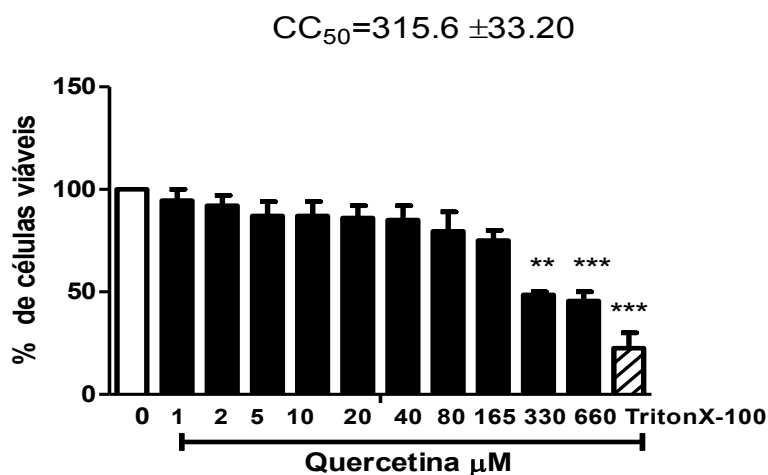
Fonte: A autora, 2017.

3.5 Avaliação da atividade da quercetina em camundongos C57BL/6.

3.5.1 - Avaliação da toxicidade em macrófagos

Com o propósito de avaliar a toxicidade da quercetina para macrófagos de camundongos C57BL/6, uma monocamada de macrófagos peritoneais foi incubada com diferentes concentrações da quercetina (0- 660 μM) por 48 horas. Após o tempo de tratamento, foi avaliada a viabilidade através do reagente MTT. De modo similar aos macrófagos de BALB/c, as células de camundongos C57BL/6, apresentaram perda da viabilidade a partir da concentração de 330 μM de quercetina. A concentração citotóxica de 50% dos macrófagos foi estimada em 315.6 μM .

Figura 31- Viabilidade celular de macrófagos de camundongos C57BL/6.



Legenda: Viabilidade celular de macrófagos de camundongos C57BL/6. Monocamadas de macrófagos de camundongos C57BL/6 foram incubadas com diferentes concentrações da quercetina, variando de 0- 660 μM por 48 horas a 37°C/5% CO₂. Após o tratamento, as células foram incubadas com MTT por 3 horas a 37°C/5% CO₂ e 100 μl de DMSO foi utilizado para a solubilização dos cristais de Formazan. O controle positivo para redução da viabilidade foi obtido utilizando 0,1% triton x-100. A absorbância foi mensurada a 570nm. (média \pm SD, n=3)**p< 0,01, ***p<0,001.

Fonte: A autora, 2017

3.5.2 Atividade anti-amastigota e determinação da IC₅₀

Para avaliar a atividade da quercetina usando macrófagos dos camundongos C57BL/6 sobre amastigotas intracelulares, monocamadas de macrófagos peritoneais desses animais foram infectadas por *L. major* e tratadas com diversas concentrações do flavonóide. O tratamento por 48 horas após a infecção (Figura 32 A) foi capaz de diminuir o índice de infecção em 72% e 82% nas concentrações de 165 μ M e 330 μ M, respectivamente, enquanto que o pré-tratamento diminuiu em 55%, 52% e 79% nas concentrações de 80, 165 e 330 μ M (Figura 32B). A IC₅₀ do tratamento por 48 horas após a infecção, foi estabelecida em torno de 13 μ M (Figura 32C) e o índice de seletividade estabelecido em 22 (Tabela 8).

Figura 32-Atividade anti-amastigota da quercetina utilizando macrófagos de camundongos C57BL/6 (Continua)

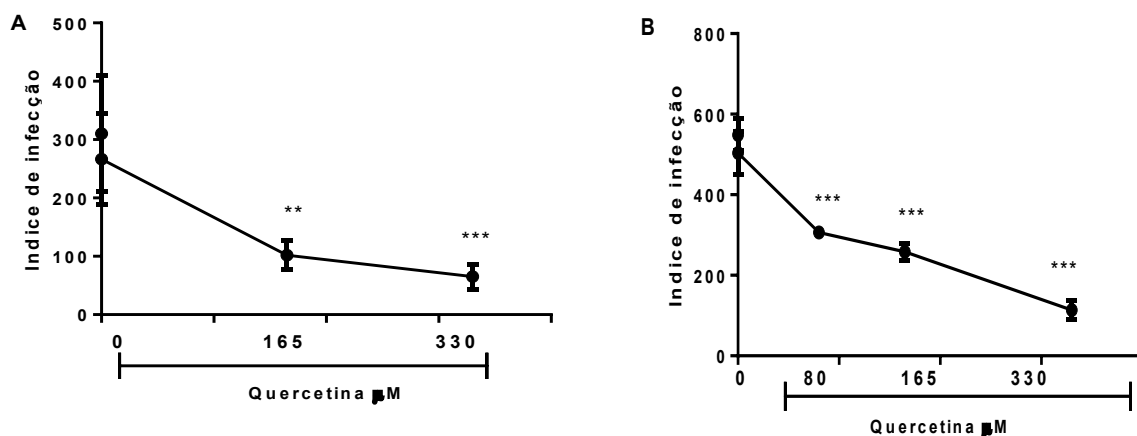
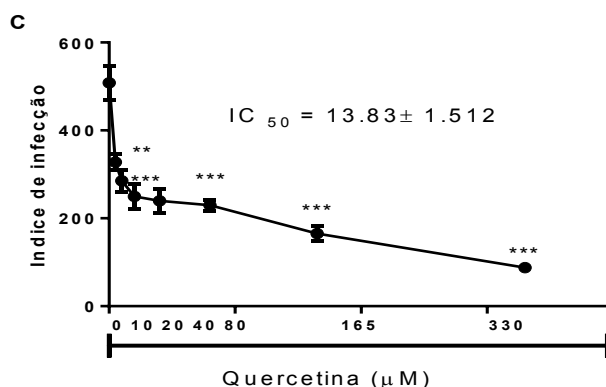


Figura 32-Atividade anti-mastigota da quercetina utilizando macrófagos de camundongos C57BL/6 (Conclusão)



Legenda: Atividade anti-mastigota da quercetina utilizando macrófagos de camundongos C57BL/6. Uma monocamada de macrófagos de camundongos C57BL/6 foi tratada por 48 horas após a infecção (A e C) e tratada por 24 horas antes da infecção (B). Controles foram macrófagos incubados com meio de cultura ou DMSO 0,02%. Em (A), após a infecção, as monocamadas de macrófagos foram tratadas por 48 horas com a quercetina. Em (B), as monocamadas receberam o tratamento com quercetina antes da infecção por 24 horas e após esse período, a quercetina foi retirada dos poços e a monocamada de células foi incubada por 24 horas com meio de cultura para retirada de resíduos da quercetina e posteriormente infectada na proporção de 5:1 por 4 horas a 37°C/5% CO₂. Após infecção, as células foram incubadas com meio de cultura RPMI e soro fetal bovino por 48h a 37°C/5% CO₂, posteriormente, as lâminulas foram coradas com panótico e o índice de infecção foi estabelecido pela contagem de pelo menos 100 macrófagos por microscopia ótica. (média ±SD, n=3) ** p < 0,01 *** p < 0,001
Fonte: A autora, 2017.

Tabela 8. Índice de seletividade da quercetina em macrófagos de camundongos C57BL/6 infectados com *L. major*

IC 50	CC50	Índice de seletividade
13.83µM	315.6µM	22

Fonte: A autora, 2017.

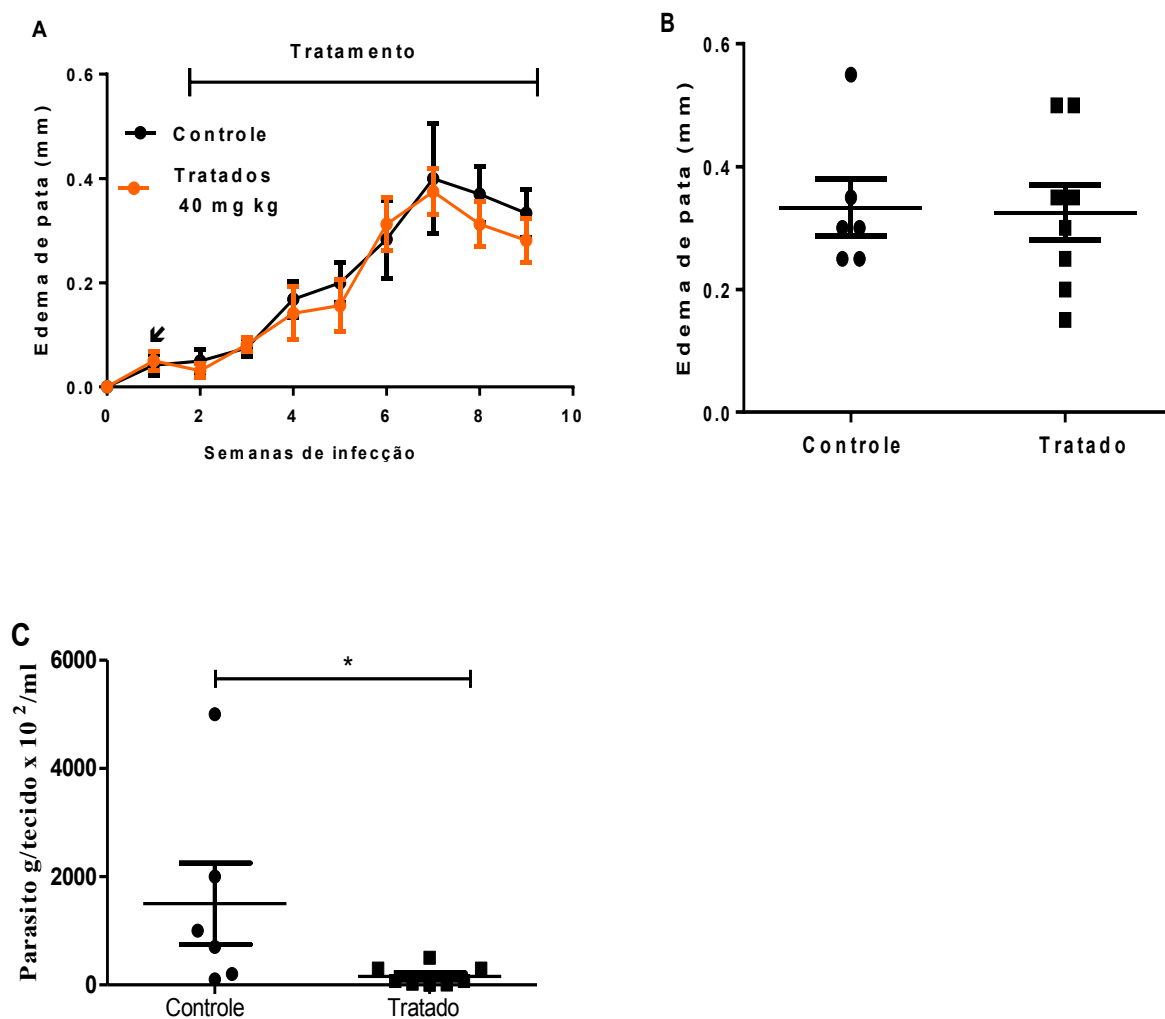
3.6 Atividade *in vivo* da quercetina em camundongos C57BL/6 infectados com *L. major*

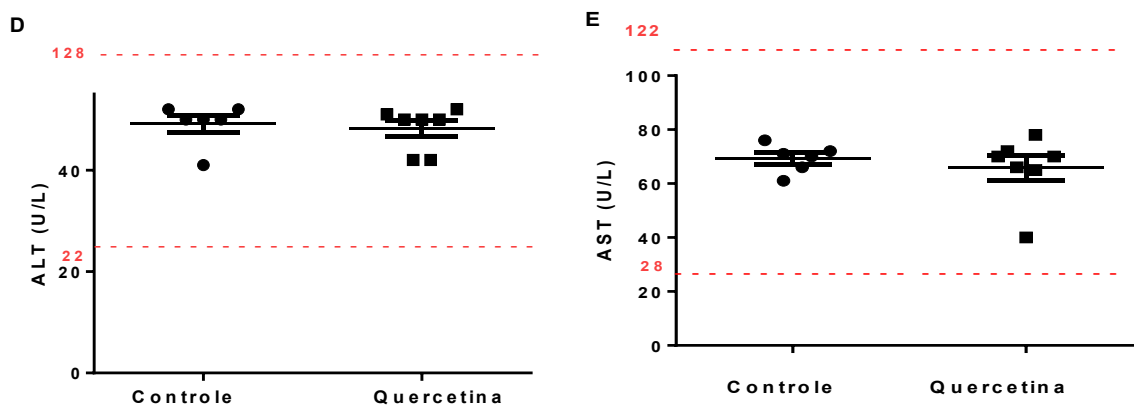
3.6.1. Tamanho da lesão e carga parasitária

Utilizando o modelo resistente à infecção com *Leishmania major*, o camundongo C57BL/6, avaliamos a ação da quercetina administrada pela via oral (20 mg/kg) a partir de 7º dia de infecção durante 7semanas. Na oitava semana observamos uma pequena diminuição no tamanho das lesões Figura (33A e B), no entanto não significativo estatisticamente. A carga parasitária da pata (Figura 33C) não foi alterada e podemos observar um aumento significativo de parasitos nos animais tratados no linfonodo drenante da lesão(Figura 33D).

alanino aminotransferase (ALT) e aspartato aminotransferase (AST) foram avaliados. ALT, AST, não foram alterados nos animais tratados com a quercetina (Figura 34D e E), segundo os valores de referência.

Figura 34-Efeito do tratamento oral com quercetina (40mg/kg) em camundongos C57BL/6 infectados com *L. major*.





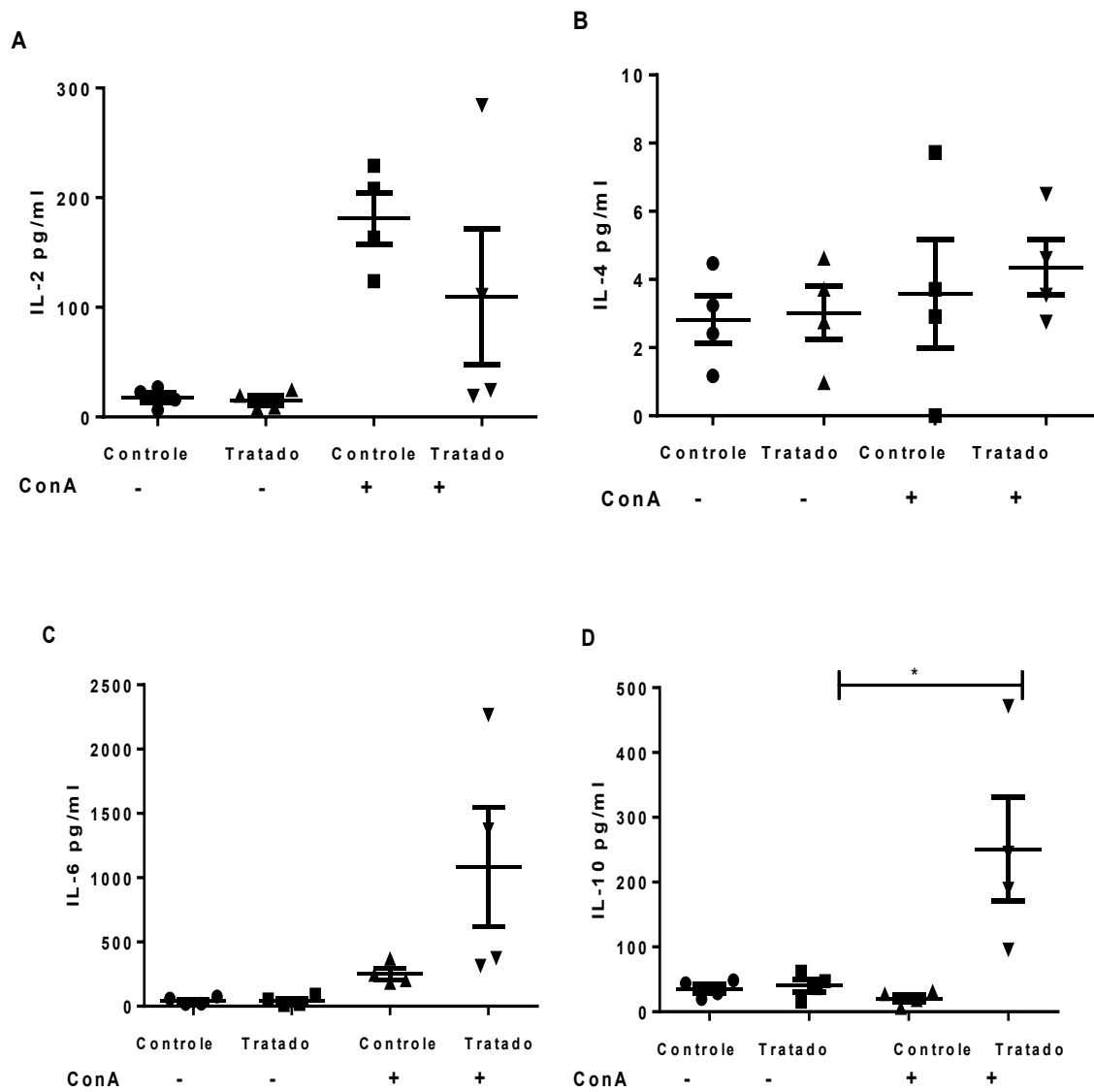
Legenda.: Efeito do tratamento oral com quercetina(40mg/kg) em camundongos C57BL/6 infectados com *L. major*. Os camundongos C57BL/6 (6/8 animais/grupo) foram infectados na pata com *L. major* e tratados com 40 mg/kg quercetina a partir do sétimo dia de infecção durante oito semanas. Controles foram animais não tratados. Em (A) o tamanho das lesões foi monitorado por medidas semanais com paquímetro (média \pm SEM) . A seta indica o início do tratamento em (B) tamanho final da lesão 9 semanas após a infecção.Cada ponto representa um animal. Em (C), carga parasitária da pata.Expresso em parasito/g tecido* $p < 0,05$. (D) Alanina aminotransferase (ALT) (E) Aspartato aminotransferase (AST).As linhas tracejadas indicam os valores mínimos e máximo de referência do CECAL- Fiocruz. * $p < 0,05$.

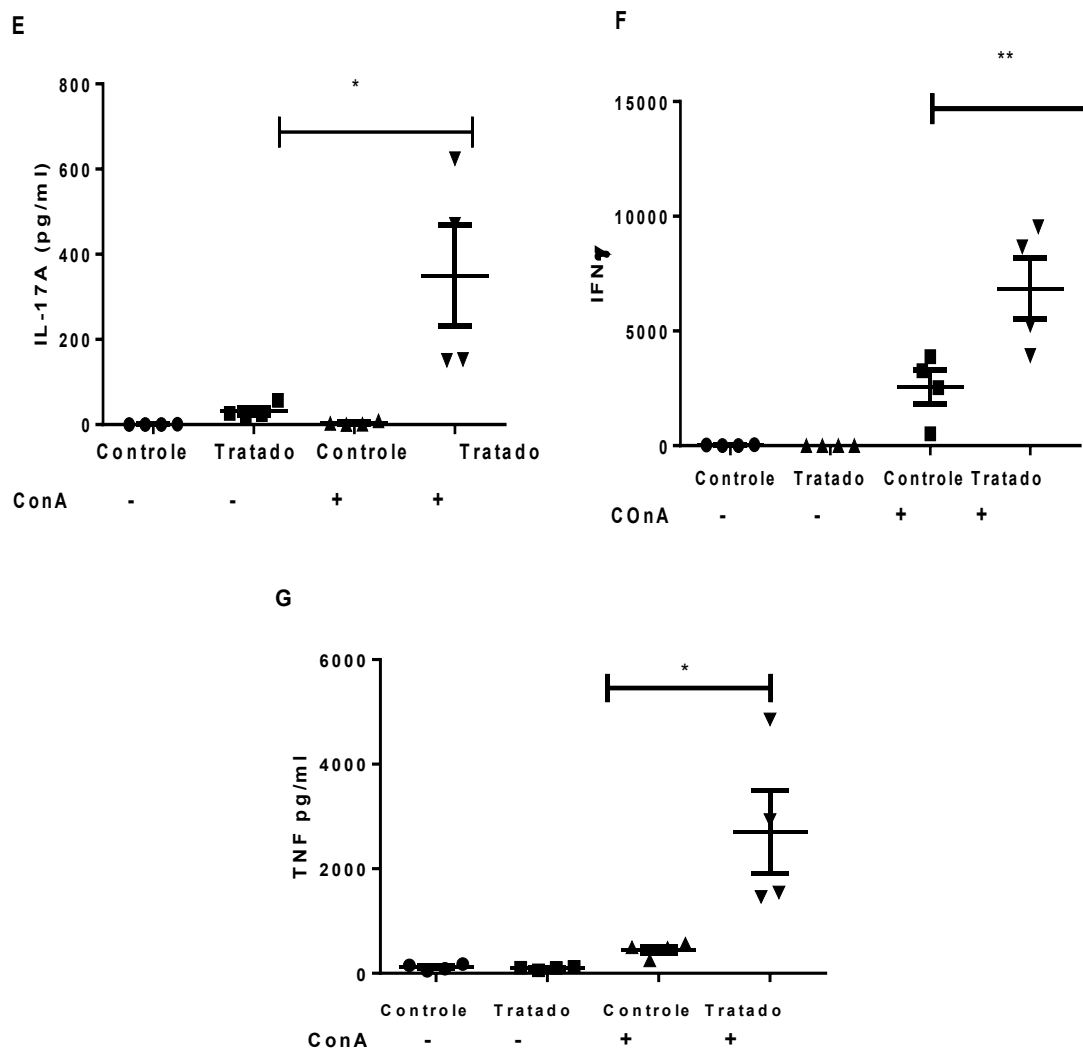
Fonte: A autora, 2017.

3.6.2 Produção de citocinas por linfócitos de camundongos C57BL/6 tratados com quercetina 40mg/kg.

Para avaliar se haveria atividade imunomoduladora da quercetina, nos animais resistentes, após 9 semanas de infecção, os animais foram eutanasiados e o baço retirado para avaliação da produção de citocinas pelos linfócitos. Foi observado que houve aumento das citocinas IL-10, IL-17A e IFN- γ e TNF- α (Figura 35D, E, F e G) em linfócitos de animais tratados com a quercetina e com estimulação mitogênica. Não houve alterações nos níveis de IL-2, IL-4 e IL-6 (Figura 35 A-C), Não houve alteração na produção de citocinas pelos linfócitos de animais sem estímulo mitogênico.

Figura 35-Produção de citocinas por linfócitos de camundongos C57BL/6 infectados com *L.major*





Legenda: Produção de citocinas por linfócitos de camundongos C57BL/6 infectados com *L. major*. Os camundongos C57BL/6 infectados com *L. major* foram tratados ou não com quercetina a partir do sétimo dia de infecção. Ao final do experimento, as células do baço foram plaqueadas 2×10^6 /ml e foram estimuladas ou não com a concanavalina A (ConA) durante 72 horas. Os sobrenadantes foram coletados e foi feita a avaliação da produção de citocinas pelo método Cytometric Bead Array (CBA) e a análise feita por citometria de fluxo. * $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, $p < 0,001$.

Fonte: A autora, 2017.

4. DISCUSSÃO

Os produtos naturais têm sido as principais fontes de substâncias bioativas para o desenvolvimento de novos fármacos. Mais de 80 % dos medicamentos atuais são oriundos de produtos naturais ou inspirados em seus compostos (HARVEY, 2008). O uso de medicamentos à base de ervas é utilizado desde longa data em tribos primitivas, nas quais mulheres se encarregavam de extrair das plantas princípios ativos para utilizar no controle de doenças. Os primeiros registros fitoterápicos datam do período de 2838 a 2698 a.C, quando um imperador Chinês catalogou cerca de 365 ervas medicinais e venenos utilizados na época (VALE, 2002).

O Brasil possui a maior biodiversidade do mundo, compreendendo mais de 50.000 espécies de plantas superiores (20-22% do total existente no planeta), mais de 500 espécies de mamíferos, cerca de 3.000 espécies de peixes, mais de 1.500 espécies de pássaros, mais de 500 espécies de anfíbios e milhões de espécies de insetos e microrganismos (CALIXTO et al., 2000). A Amazônia é a maior reserva de produtos naturais com ação fitoterápica do planeta. Por este motivo e pela grande tradição do uso das plantas medicinais pela medicina popular no Brasil, o interesse pelos estudos fitoquímicos e das propriedades farmacológicas das plantas, vem sendo explorado extensivamente pelos pesquisadores brasileiros. Atualmente, há interesse pela indústria farmacêutica em desenvolver novos medicamentos, o que permite que este crescimento ganhe destaque no cenário científico mundial (YUNES, 2001; FRANCA et al., 2008; CHEUKA et al., 2016).

Neste cenário, metabólitos secundários de plantas, como os flavonóides tem sido estudados experimentalmente na leishmaniose. O flavonóide quercetina possui inúmeras atividades biológicas, inclusive atividade contra diversas espécies de *Leishmania* (MUZITANO et al., 2006, 2009a; SEN et al., 2008; FONSECA-SILVA et al., 2011, 2013).

O presente estudo avaliou o potencial da quercetina em dois modelos experimentais de leishmaniose tegumentar: O modelo de infecção por *Leishmania braziliensis*, causadora da leishmaniose tegumentar nas Américas e a espécie mais importante no Brasil e o modelo de infecção por *Leishmania major* causadora da leishmaniose tegumentar em países do Velho Mundo, a qual é bem estudada do ponto de vista da resposta imune em camundongos.

Foi avaliada a ação *in vitro* e *in vivo* da quercetina em *L. braziliensis* e *L. major*. O ensaio em promastigotas de *L. braziliensis*, demonstrou que, nas concentrações testadas no ensaio, não mostrou ação inibitória significativa nesta forma evolutiva do parasito (Figura 14). Em um estudo feito por MARÍN et al., 2009, o flavonóide quercetina isolado da planta *Consolida oliveriana*, apresentou efeito antiproliferativo em promastigotas de *L. braziliensis*, apresentando uma IC₅₀ de 53 μM. No entanto, a cepa do parasito utilizada é diferente do presente estudo (MHOM/BR/1975/M2904) e houve diferenças na metodologia utilizada, o que pode explicar a diferença nos resultados (MARÍN et al., 2009).

Por outro lado, em promastigotas de *L. major* (Figura 22), a quercetina foi capaz de promover diminuição da proliferação nas concentrações de 330 e 660 μM. Em estudo em que extratos de uma planta chamada *Quercus infectoria*, que possui a quercetina entre os seus metabólitos, verificou-se que esse extrato diminuiu a proliferação de *L. major*, estabelecendo uma IC₅₀ de 12,65 μg em promastigotas (KHEIRANDISH et al., 2016).

Em outras espécies de *Leishmania*, a quercetina também promove inibição da proliferação de promastigotas, como demonstrado por FONSECA-SILVA et al., 2011, que foi estabelecida IC₅₀ de 31,4 μM para *L. amazonensis*. Em *L. donovani*, a inibição da proliferação do parasito foi relacionada à inibição da enzima topoisomerase I e II do parasito, utilizando em torno de 198 e 100 μM de quercetina (MITTRA et al., 2000). Estes dados mostram que há diferenças a sensibilidade e cepas do parasito.

A concentração citotóxica para célula de mamífero (CC₅₀) foi estimada em torno de 468, 343 e 315 μM (Figuras 15, 23 e 31) para macrófagos de Hamsters, camundongos BALB/c e C57BL/6, respectivamente, tratados por 48 horas. Embora esses resultados mostrem pouca diferença entre si, em outros estudos são encontrados valores divergentes. No estudo de MARÍN et al., 2009, a CC₅₀ foi estimada em 125 μM em macrófagos J774.2 tratados por 72 horas com a quercetina. No trabalho de FONSECA-SILVA et al., 2013, a CC₅₀ em macrófagos peritoneais de camundongos BALB/c foi estimada em 80,2 μM, com um tempo de tratamento de 72 horas. As variações da concentração podem ser explicadas pela utilização de diferentes tipos celulares, como a J774.2 e o tempo de tratamento, que em ambos trabalhos foram de 72 horas, enquanto que no presente estudo foi de 48 horas.

A avaliação da atividade anti-amastigota da quercetina em *L. braziliensis* (Figura 16) mostrou inibição a partir da concentração de 40 μM, sendo a IC₅₀ estabelecida em 20 μM em 48 horas. Em *L. major* (Figura 24 e 32), a IC₅₀ foi estabelecida em torno de 14 μM (macrófagos de BALB/c e C57BL/6). FONSECA-SILVA et al., 2013, observaram que a IC₅₀ em amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* foi estimada em 3,4 μM em 72 horas.

de tratamento. Nos estudos de MUZITANO et al., 2006, utilizando quercetina isolada da planta *kalanchoe pinnata*, estimaram a IC50 também de *L. amazonensis* em torno de 78 μ M. Esses dados mostram que a quercetina tem atividade anti-amastigota em várias espécies de *Leishmania*. As diferenças encontradas na IC50 podem refletir as variações na sensibilidade de cada espécie e também o protocolo utilizado, sobretudo o tempo de tratamento com a quercetina.

O índice de seletividade da quercetina em amastigotas intracelulares *L. braziliensis* e *L. major*, foi calculado em 22, em macrófagos infectados de hamsters e camundongos C57BL/6 e 23 em macrófagos de camundongos BALB/c (Tabela 6, 7 e 8), sendo 22 e 23 vezes mais seletivo para o parasito do que para a célula hospedeira. De acordo com WENIGER et al., (2001), a eficácia biológica de um composto é mais segura, quando o índice de seletividade é ≥ 10 (WENIGER et al., 2001).

O tratamento de macrófagos de hamsters por 24 horas com a quercetina antes da infecção também foi capaz de reduzir o número de amastigotas intracelulares de *L. braziliensis*. Considerando que a quercetina não apresentou ação em promastigotas nessa espécie (Figura 14), essa redução do número de amastigotas poderia estar ocorrendo devido a uma possível ativação do macrófago. Entretanto, dados da literatura relatam que a quercetina é capaz de inibir a enzima óxido nítrico sintase induzível (CHEN et al., 2005, 2001; NIEMINEN et al., 2007) e nossos estudos anteriores demonstraram que o tratamento prévio de macrófagos com a quercetina não altera a produção de óxido nítrico (SANTOS, 2012).

Desta forma, foi investigado se a quercetina induziria a produção de ROS. A quercetina pode ter um potencial antioxidante, ou agir como pró-oxidante, em situações como alto pH e a presença de metais de transição, induzindo a produção de ROS (SAKIHAMA; COHEN; GRACE, 2002), dependendo também do tipo celular e tempo de exposição ao tratamento com a quercetina (BOOTS et al., 2007; MAY et al., 1999).

A atividade pró-oxidante de um flavonóide é diretamente proporcional ao número de grupos hidroxila na sua molécula (CAO et al., 1997). No estudo de MAY et al., (1999) a concentração da quercetina que diminuía a viabilidade de células CHO era a partir da concentração de 200 μ M, sugerindo que nesta concentração a quercetina possuía perfil pró-oxidante. Dados anteriores mostraram que macrófagos tratados com quercetina por 24 horas antes da infecção por *L. braziliensis*, apresentaram aumento de ROS (SANTOS, 2012). No presente estudo avaliamos se a quercetina induziria a produção de ROS em macrófagos de hamsters não infectados e infectados com *L. braziliensis* (Figura 18 e

19). Em macrófagos tratados por 24 e 48 horas com a quercetina, foi observado um aumento da produção de ROS e H₂O₂ de maneira dose dependente, (Figura 19). Esse fato sugere que a quercetina pode estar modulando o macrófago para um estado pró-oxidante, sem alterar a viabilidade nas concentrações testadas (Figura 15).

No trabalho de FONSECA-SILVA et al., 2013, o tratamento dos macrófagos não-infectados com a quercetina não foi capaz de induzir a produção de ROS, no entanto, as concentrações utilizadas foram de até 12 µM, bem mais baixas do que neste estudo que foram de 165 e 330 µM.

Em macrófagos tratados por 48 horas após a infecção com *L. braziliensis*, observamos, que a produção de ROS e H₂O₂ é aumentada de maneira dose-dependente (Figura 19) sugerindo que este mecanismo, pode contribuir para a redução do índice de infecção. Em macrófagos infectados com *L. amazonensis*, a quercetina aumentou a produção de radicais produzidos após 72 horas de tratamento (FONSECA-SILVA et al., 2013).

O efeito terapêutico da quercetina no modelo *L. braziliensis* foi avaliado em hamsters golden (*Mesocricetus auratus*). Este modelo animal é o que mais representa a doença humana causada por *L. braziliensis* (GOMES-SILVA et al., 2013; LORÍA-CERVERA; ANDRADE-NARVÁEZ, 2014; RIBEIRO-ROMÃO et al., 2014). Utilizando a dose de 20 mg/kg /dia, os hamsters infectados foram submetidos ao tratamento por via oral a partir do 7º dia de infecção (Figura 20), apresentando diferença significativa do tamanho da na última semana de tratamento e diminuição da carga parasitária na pata e nos linfonodos drenantes (Figura 20 C e D). Os animais tratados após o estabelecimento da lesão, não apresentaram diferenças no tamanho da lesão, em relação aos animais não tratados, entretanto observou-se diminuição da carga parasitária na pata e nos linfonodos drenantes da lesão (Figura 21).

Na leishmaniose experimental por *L. donovani*, hamsters tratados com a quercetina pela via oral duas vezes na semana na dose de 14 mg/ kg/ dia, apresentaram uma diminuição da carga parasitária no baço (MITTRA et al., 2000) e o mecanismo de ação relacionado a inibição da topoisomerase II de *Leishmania donovani*.

Os resultados *in vitro* do presente estudo, apontam para a indução da produção de ROS em macrófagos, fator que possivelmente está relacionado a diminuição do número de amastigotas de *L. braziliensis*. Sabe-se que a produção de ROS *in vivo*, pode ser tóxica e mutagênica para células eucarióticas, estando associada a inflamação e doenças degenerativas (BALABAN; NEMOTO; FINKEL, 2005). No entanto, uma revisão feita por HARWOOD et al., 2007, não apontou evidências da atividade tóxica e mutagênica nos

estudos por ele relatados *in vivo* tanto em humanos, quanto em animais experimentais (HARWOOD et al., 2007).

Estudos mostram que o potencial genotóxico da quercetina mediado pelo stress oxidativo é minimizado pela degradação microbiana da quercetina no intestino, assim como pela metabolização, resultando numa baixa disponibilidade e rápida excreção na urina. (HOLLMAN, 2001; BOOTS et al., 2007; HARWOOD et al., 2007)

A administração oral da quercetina é capaz de controlar a artrite reumatóide em ratos suprimindo a produção de IFN γ em linfócitos T (SUN et al., 2008). A quercetina interfere também com a ação da IL-12 bloqueando a via de sinalização JAK-STAT diminuindo a diferenciação do linfócito T CD4 em Th1, permitindo o controle de encefalomielite em camundongos (MUTHIAN & BRIGHT, 2004). Na miocardite auto-imune, em ratos, age interferindo a produção de citocinas pró-inflamatórias, como TNF- α e IL-17, ou anti-inflamatórias como IL-10 (MILENKOVIĆ et al., 2010). Em camundongos obesos, a quercetina suprime o *stress* oxidativo e a atividade do NF- κ B contribuindo para a prevenção do acúmulo de células do sistema imune, o que resultaria na inflamação crônica (KOBORI et al., 2016). Em ratos, diminuiu sinais histológicos de inflamação suprimindo o recrutamento de leucócitos, diminuindo os níveis de quimiocinas e níveis de peroxidação lipídica, além de aumentar a atividade enzimática antioxidante (DONG et al., 2014).

O potencial imunomodulador da quercetina nos levou a investigar de que modo a quercetina poderia modular a infecção experimental tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Devido as limitações no modelo hamster, em relação a estudos por imunoenaios, investigamos no modelo de camundongo infectado por *L. major*, que possui maior disponibilidade de reagentes e estudos bem delineados da resposta imune.

Em macrófagos de camundongos BALB/c infectados e tratados por 48 horas com a quercetina (Figura 26), a produção de citocinas inflamatórias foi reduzida, IL-6 e TNF, enquanto a produção de IL-10 foi aumentada. A quimiocina MCP-1 foi aumentada na concentração de 165 μ M e apresentou uma diminuição da concentração de 330 μ M, em relação ao controle.

IL-6 é uma citocina pleiotrópica envolvida na regulação das respostas inflamatórias, ao se ligar no receptor IL-6R α , a IL-6 dispara a dimerização do receptor de transdução de sinal GP130 ou CD130, e sua fosforilação e a subsequente ativação de Janus tirosina cinase (JAK) (HIRANO; NAKAJIMA; HIBI, 1998; KISHMOTO, 2005), que levam a ativação de fatores de transdução e ativação de sinais STAT 1 e STAT 3. A quercetina é um potente inibidor da via de sinalização JAK/STAT-3, reduzindo a proliferação e

migração de células tumorais(MICHAUD-LEVESQUE; BOUSQUET-GAGNON; BÉLIVEAU, 2012).

Sabe-se que o tratamento com a quercetina é capaz de inibir produção de TNF, através da modulação de NF κ B (NAIR ET AL., 2006; RUIZ ET AL., 2007;HALEAGRAHARA et al., 2017). Portanto, a diminuição de IL-6 e TNF observadas nos macrófagos tratados estão de acordo com os dados da literatura.

A MCP-1 é uma quimiocina também conhecida como CCL2, pode ser produzida por diferentes células e é responsável pela migração de monócitos e macrófagos para o tecido (ROLLINS, 1996;RITTER et al., 2017). O aumento da MCP-1 em macrófagos infectados com *L.major* e tratados com a quercetina, sobretudo na concentração de 165 μ M (Figura 26)contrasta de dados da literatura em que observa-se que o tratamento com a quercetina promove uma inibição desta quimiocina, ainda que outros tipos celulares, como adipócitos e mastócitos(CASTELLANI et al., 2007;CHUANG et al., 2010). No entanto, estudos relatam que a infecção de macrófagos por *L. major* podem aumentar a produção de MCP-1(MATTE; OLIVIER, 2002; RABBI et al., 2012)..

O tratamento com a quercetina em macrófagos infectados aumentaram de maneira dose-dependente os níveis de IL-10 (Figura 26). Em um estudo com camundongos com inflamação sistêmica induzida por LPS, a quercetina foi capaz de aumentar níveis de IL-10 em macrófagos peritoneais desses animais (LIAO; LIN, 2015). A citocina IL-10 age como uma citocina anti-inflamatória e supressora(BOGDAN; VODOVOTZ; CARL NATHAN, 1991; GALDINO et al., 2016) Os resultados do presente estudo, estão de acordo com dados da literatura que mostram a ação anti-inflamatória da quercetina modulando citocinas pró-inflamatórias.

Para avaliar o impacto do efeito imunomodulador da quercetina *in vivo*, foram utilizados os camundongos BALB/c e C57BL/6 infectados com *L. major*. Em camundongos BALB/ c infectados com *L. major*, o tratamento com a quercetina só foi capaz de reduzir o tamanho da lesão quando tratados com 40 mg/ kg da quercetina (Figura 28), entretanto observamos significativa redução da carga parasitária da lesão e linfonodo drenante nas duas doses administradas (Figura 27 e 28). Em camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* e tratados com quercetina pela via oral na dose de 16 mg/kg, foi observada diminuição do tamanho da lesão e da carga parasitária em relação aos animais não tratados (MUZITANO et al., 2009).

Em linfócitos esplênicos de BALB/ c infectados e tratados com 40 mg/ kg da quercetina, houve um aumento das citocinas IL-2, IL-4 e IL-6, sem alterar os níveis de IL-10, IL-17,

IFN- γ e TNF (Figura 30). O tratamento oral de camundongos resistentes à *L. major*, C57BL/6, com 20 mg/ kg não foi capaz de diminuir o tamanho da lesão e a carga parasitária nesses animais (Figura 33). Os animais tratados com 40 mg/kg de quercetina, embora não tenham apresentado diminuição do tamanho da lesão, apresentaram diminuição na carga parasitária (Figura 34). A produção de citocinas nos linfócitos esplênicos desses animais tratados com 40 mg/ kg da quercetina, mostrou aumento nos níveis de IL-10, IL-17, IFN- γ e TNF. Os níveis das citocinas IL-2, IL-4, IL-6 não apresentaram alterações em relação ao grupo controle (Figura 35).

No modelo suscetível, observamos o aumento das citocinas IL-2, IL-4 e IL-6 (Figura 30). A IL-2 está envolvida no crescimento celular de linfócitos B e T e nas respostas imunes primárias e de memória *in vivo* (SAPAROV et al., 1999; MASPI; ABDOLI; GHAFFARIFAR, 2016), é capaz de modular a expressão dos receptores das citocinas IL-12, IL-4, IL-2 e IL-6 para a diferenciação celular em Th1, Th2, Treg e Th17 (LIAO et al., 2009, 2011).

Foi relatado que células do linfonodo de camundongos BALB/ c infectados com *L. major*, produziam 6 vezes mais IL-2 em cultura do que os camundongos C57BL/6 resistentes e isso foi associado a progressão da doença (HEINZEL et al., 1998). Em outro estudo *in vitro*, nos estágios iniciais da infecção, foi demonstrado que a *Leishmania major* também pode escapar do sistema imune via supressão da produção da citocina IL-2 e seus receptores em linfócitos T (KHODADADI et al., 2013). Na infecção humana por *L. braziliensis*, a IL-2 pode modular a suscetibilidade da doença, aumentando a proteção contra lesões cutâneas (OLIVEIRA et al., 2015). No presente estudo observamos o aumento desta citocina, sobretudo em linfócitos de animais tratados com a quercetina. Entretanto, a quercetina promove uma diminuição nos níveis desta citocina, como na inflamação induzida por LPS em macrófagos murinos (XUE et al., 2017) e também é relatada suprimir a produção de IL-2 e IFN- γ em linfócitos T (YU et al., 2008).

Como no presente estudo, trata-se de animais infectados com *L. major* e foi relatado anteriormente que os níveis desta citocina são maiores em animais suscetíveis, é possível que o tratamento com a quercetina não tenha sido eficiente em controlar esse níveis nesses animais suscetíveis (BALB/ c).

A IL-4 é uma importante citocina envolvida na suscetibilidade da infecção, pois a IL-4 é capaz de regular negativamente a produção de IL-12 e conseqüentemente uma resposta Th1 eficiente (MOHRS et al., 1999; RADWANSKA et al., 2007). Em modelos experimentais murinos de doenças respiratórias inflamatórias, o tratamento oral com a

quercetina, além de reduzir o recrutamento de eosinófilos, diminuiu a produção de IL-4, nos sítios inflamatórios (ROGERIO et al., 2010).

No presente estudo, os camundongos BALB/c infectados e tratados com quercetina apresentaram um aumento dos níveis de IL-4 e IL-6 em relação aos não-tratados (Figura 30). Na infecção por *L. major*, como resultado da disseminação, células TCD4⁺ produtoras de IL-4, podem ser encontradas no fígado e no baço duas semanas após a infecção (SACKS, 2002). Desta forma, é possível que o tempo de infecção destes animais (10 semanas) tenham contribuído para o aumento dos níveis de IL-4. O aumento dos níveis de IL-6 nos animais tratados (Figura 30), também pode ter induzido um aumento da produção de IL-4, pois a IL-6 participa na diferenciação de células CD4 em células TH₂, através da indução da produção de IL-4 e também inibe a via de sinalização de IFN- γ , desta forma, impedindo a formação de uma resposta Th1 (RINCÓN et al., 1997; DIEHL et al., 2000).

Os efeitos supressores da IL-10 tem papel crucial no desenvolvimento da infecção. Linfócitos T e células apresentadoras de antígenos são importantes fontes desta citocina. Em um estudo com camundongos C57BL/6 e BALB/c infectados com *L. major* deficientes em IL-10 específica de linfócito T, foi observado que a lesão desses animais apresentou um aumento significativo, acompanhado de aumento de IFN- γ e IL-4 nos linfonodos drenantes da lesão no início da infecção (FIORENTINO et al., 1999; SCHWARZ et al., 2013). No presente estudo, os animais resistentes a *L. major* tratados com a quercetina durante 8 semanas, apresentaram aumento nos níveis de IL-10, o que corrobora com estudos em outros modelos experimentais de inflamação, como a inflamação sistêmica induzida pelo LPS (LIAO & LIN, 2017)

Na Leishmaniose mucosa, a superprodução de IFN γ , é considerada um fator que exacerba a patologia. Na leishmaniose experimental por *L. major*, em camundongos C57BL/6, foi visto que na ausência da IL-10, a IL-17, contribui para a inflamação e dano tecidual, mediando a imunopatologia da doença (LOMBANA et al., 2013). A IL-17 também pode induzir citocinas pro-inflamatórias como IL-6 e TNF e quimiocinas (MASPI; ABDOLI; GHAFARIFAR, 2016). Já foi relatado também que nesses camundongos (C57BL/6), as células Th17 estão associadas com um papel protetor, devido ao aumento da proliferação celular, recrutamento de neutrófilos e macrófagos classicamente ativados, prevenindo o desenvolvimento da lesão (WU et al., 2010). Por outro lado, a suscetibilidade dos camundongos BALB/ também foi associada a produção de IL-17. Os camundongos deficientes desta citocina produziram menor número de neutrófilos, quando comparados aos camundongos selvagens, desta forma, associando a produção de IL-17 ao recrutamento

de neutrófilos contribuindo para a progressão da doença(LOPEZ KOSTKA et al., 2009).Entretanto, vários trabalhos relacionam o tratamento experimental com a quercetina com a diminuição de citocinas pró-inflamatórias como IL-17 e TNF, como no tratamento da artrite experimental em camundongos C57BL/6, onde o tratamento com a quercetina foi capaz de reduzir a severidade da lesão, diminuindo os níveis destas citocinas (HALEAGRAHARA et al., 2017).

O perfil de resistência dos camundongos C57BL/6 está associado a resposta tipo 1, com aumento de citocinas pró-inflamatórias como IFN- γ e TNF- α , que estimula a síntese da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), levando a produção de óxido nítrico e controle dos parasitos. Os linfócitos de animais tratados com a quercetina aumentaram o nível dessas citocinas (Figura 35). Entretanto, outros estudos demonstraram que o tratamento com a quercetina pode suprimir os níveis de IFN- γ e TNF(LEE et al., 2013;HEEBA; MAHMOUD; HANAFY, 2014(HALEAGRAHARA et al., 2017).

Os resultados deste estudo mostram que a quercetina foi capaz de diminuir o número de amastigotas intracelulares nos três modelos experimentais de infecção e que esse efeito tem relação com a produção de ROS promovida por macrófagos infectados com ou não infectados com *L. braziliensis*, sem que ocorra dano a célula hospedeira. Além disso, observou-se uma modulação na produção de citocinas em macrófagos infectados com *L. major*. *In vivo*, o tratamento experimental promoveu diminuição da carga parasitária, o edema da lesão e modulação da produção de citocinas, que pode contribuir para o seu efeito terapêutico.

CONCLUSÕES

In vitro a quercetina apresentou efeito antiparasitário em *L. braziliensis* e *L. major*, sobretudo na forma amastigota intracelular. Também foi capaz de induzir a produção de ROS em macrófagos de hamsters infectados ou não com *L. braziliensis*. Em macrófagos de camundongos BALB/c infectados com *L. major*, a quercetina modulou a produção de citocinas para um perfil anti-inflamatório.

Em hamsters infectados com *L. braziliensis*, o tratamento pela via oral com 20 mg/ kg de quercetina iniciado sete dias após a infecção, foi capaz de diminuir tanto o tamanho da lesão quanto a carga parasitária. Entretanto, o tratamento após a lesão estabelecida não foi capaz de controlar o desenvolvimento da lesão, no entanto, reduziu a carga parasitária.

Em camundongos BALB/ c infectados com *L. major*, o tratamento pela via oral com 20 mg/ kg de quercetina reduziu a carga parasitária sem diminuir o tamanho da lesão. O tratamento com 40 mg/ kg da quercetina foi capaz de diminuir tanto a lesão quanto a carga parasitária. Em camundongos resistentes, C57BL/6, tratados com 40 mg/ kg de quercetina, houve redução da carga parasitária. Embora o tratamento com quercetina não tenha mudado o perfil de citocinas produzidas em cada modelo, induziu significativo aumento em sua produção.

REFERÊNCIAS

- AGO, T. et al. Phosphorylation of p47phox directs phox homology domain from SH3 domain toward phosphoinositides, leading to phagocyte NADPH oxidase activation. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 100, n. 8, p. 4474–9, 2003.
- AGUILAR-TORRENTERA, F.; CARLIER, Y. Immunological factors governing resistance and susceptibility of mice to *Leishmania major* infection. **Revista Latinoamericana De Microbiología**, v. 43, n. 3, p. 135–142, 2005.
- AHN, J. et al. The anti-obesity effect of quercetin is mediated by the AMPK and MAPK signaling pathways. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 373, n. 4, p. 545–549, 2008.
- AHUA, K. M. et al. Antileishmanial and antifungal acridone derivatives from the roots of *Thamnosma rhodesica*. **Phytochemistry**, v. 65, n. 7, p. 963–968, 2004.
- ALCAZAR, W. et al. Betulin derivatives impair *Leishmania braziliensis* viability and host–parasite interaction. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 22, n. 21, p. 6220–6226, 2014.
- ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A R.; RUSSELL, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **Journal of cell science**, v. 112 Pt 18, p. 2993–3002, 1999.
- ALIAGA, J. C. et al. Requirement of the MAP kinase cascade for cell cycle progression and differentiation of human intestinal cells. **Am J Physiol**, v. 277, n. 3 Pt 1, p. G631–41, 1999.
- ALLENBACH, C. et al. An essential role for transmembrane TNF in the resolution of the inflammatory lesion induced by *Leishmania major* infection. **European Journal of Immunology**, v. 38, n. 3, p. 720–731, 2008.
- ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS ONE**, v. 7, n. 5, 2012.
- ALVAREZ-RUEDA, N.; BIRON, M.; LE PAPE, P. Infectivity of *Leishmania mexicana* is associated with differential expression of protein kinase C-like triggered during a cell-cell contact. **PLoS ONE**, v. 4, n. 10, 2009.
- AMARAL, F. M. M. et al. Plants and chemical constituents with giardicidal activity. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 16, p. 696–720, 2006.
- AMATO, V. S. et al. Mucosal leishmaniasis. Current scenario and prospects for treatment. **Acta Tropica**, v. 105, n. 1, p. 1–9, 2008.

ANAND, S.; MADHUBALA, R. Genetically Engineered Ascorbic acid-deficient Live Mutants of *Leishmania donovani* induce long lasting Protective Immunity against Visceral Leishmaniasis. **Scientific reports**, v. 5, n. April, p. 10706, 2015.

ANGÉLICA, A. et al. Communication Report Effectiveness of miltefosine-pentoxifylline compared to miltefosine in the treatment of cutaneous leishmaniasis in C57Bl / 6 mice. v. 47, n. October 2013, p. 517–520, 2014.

ARUMUGAM, S. et al. Quercetin offers cardioprotection against progression of experimental autoimmune myocarditis by suppression of oxidative and endoplasmic reticulum stress via endothelin-1/MAPK signalling. **Free Radical Research**, v. 46, n. 2, p. 154–163, 2012.

ASHOK, D. et al. Cross-presenting dendritic cells are required for control of *Leishmania major* infection. **European Journal of Immunology**, v. 44, n. 5, p. 1422–1432, 2014.

ATIA, A. M. et al. Sodium stibogluconate and paromomycin for treating visceral leishmaniasis under routine conditions in eastern Sudan. **Tropical Medicine and International Health**, v. 20, n. 12, p. 1674–1684, 2015.

AZMI, A. S. et al. Plant polyphenols mobilize endogenous copper in human peripheral lymphocytes leading to oxidative DNA breakage: A putative mechanism for anticancer properties Asfar. **International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v. 38, n. 12, p. 2074–2081, 2005.

AZUMA, T. et al. Supplemental naringenin prevents intestinal barrier defects and inflammation in colitic mice. **J Nutr**, v. 143, p. 827–834, 2013.

BACELLAR, O. et al. Up-Regulation of Th1-Type Responses in Mucosal Leishmaniasis Patients. **INFECTION AND IMMUNITY**, v. 70, n. 12, p. 6734–6740, 2002.

BALABAN, R. S.; NEMOTO, S.; FINKEL, T. Review. v. 120, p. 483–495, 2005.

BALAN~A-FOUCE, R. et al. The pharmacology of leishmaniasis. **Pharmacology**, v. 337, n. Suppl. 12, p. 118–284, 1998.

BALDOMINOS, G.; GONZÁLEZ, M.; MARI, C. Revista Iberoamericana de Micología Análisis de la utilización de anfotericina B liposomal. v. 31, n. 2, p. 109–113, 2015.

BALLIF, B. A.; BLENIS, J. Molecular mechanisms mediating mammalian mitogen-activated protein kinase (MAPK) kinase (MEK)-MAPK cell survival signals. **Cell growth & differentiation: the molecular biology journal of the American Association for Cancer Research**, v. 12, n. 8, p. 397–408, 2001.

BARBI, J.; BROMBACHER, F.; SATOSKAR, A. R. T Cells from *Leishmania major*-Susceptible BALB/c Mice Have a Defect in Efficiently Up-Regulating CXCR3 upon Activation. **The Journal of Immunology**, v. 181, n. 7, p. 4613–4620, 2008.

BARTHOLOMEU, D. C. et al. Unveiling the Intracellular Survival Gene Kit of Trypanosomatid Parasites. **PLoS Pathogens**, v. 10, n. 12, 2014.

BECKER, I. et al. Leishmania lipophosphoglycan (LPG) activates NK cells through toll-like receptor-2. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 130, n. 2, p. 65–74, 2003.

BEGUM, S. et al. Leishmanicidal triterpenes from *Lantana camara*. **Chemistry and Biodiversity**, v. 11, n. 5, p. 709–718, 2014.

BEHLING, E. B. et al. Flavonóide Quercetina : Aspectos Gerais E. **Alimentos e Nutrição - Brazilian Journal of Food and Nutrition**, v. 15, n. 3, p. 285–292, 2004.

BERMAN, J. D. Human Leishmaniasis : Clinical , Diagnostic , and Chemotherapeutic Developments in the Last 10 Years Author (s): J . D . Berman Published by : Oxford University Press Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/4481074> Accessed : 28-06-2016 15 : 07 UTC You. v. 24, n. 4, p. 684–703, 1997.

BERMAN, J. (JOSH). Treatment of leishmaniasis with miltefosine: 2008 status. **Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology**, v. 4, n. 9, p. 1209–1216, 2008.

BERMAN, J. D. et al. Effects of ketoconazole on sterol biosynthesis by *Leishmania mexicana mexicana* amastigotes in murine macrophage tumor cells. **Molecular and biochemical parasitology**, v. 20, n. 1, p. 85–92, 1986.

BERO, J. et al. In vitro antitrypanosomal and antileishmanial activity of plants used in Benin in traditional medicine and bio-guided fractionation of the most active extract. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 137, n. 2, p. 998–1002, 2011.

BHANDARI, V. et al. Elucidation of cellular mechanisms involved in experimental paromomycin resistance in *Leishmania donovani*. **Antimicrobial agents and chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 2580–2585, 2014.

BIANCHI, M. E. DAMPs, PAMPs and alarmins: all we need to know about danger. **Journal of leukocyte biology**, v. 81, n. 1, p. 1–5, 2007.

BIEDERMANN, T. et al. IL-4 instructs TH1 responses and resistance to *Leishmania major* in susceptible BALB/c mice. **Nat Immunol**, v. 2, n. 11, p. 1054–1060, 2001.

BITTAR, R. D. C.; COUTINHO, S. G. Can interferon- γ and interleukin- 10 balance be associated with severity of human *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection ? n. *ML*, p. 440–444, 2007.

BOAVENTURA, V. S. et al. Human mucosal leishmaniasis: Neutrophils infiltrate areas of tissue damage that express high levels of Th17-related cytokines. **European Journal of Immunology**, v. 40, n. 10, p. 2830–2836, 2010.

BOGDAN, C.; RÖLLINGHOFF, M. The immune response to *Leishmania*: Mechanisms of parasite control and evasion. **International Journal for Parasitology**, v. 28, n. 1, p. 121–134, 1998.

BOGDAN, C.; VODOVOTZ, Y.; CARL NATHAN. Macrophage Deactivation by Interleukin 10. **J. Exp. Med**, v. 303, n. December, p. 253–258, 1991.

BOOTS, A. W. et al. The quercetin paradox. v. 222, p. 89–96, 2007.

BRUNSWICK, N. Secondary Metabolites. p. 87–88, 1999.

BUATES, S.; MATLASHEWSKI, G. Treatment of experimental leishmaniasis with the immunomodulators imiquimod and S-28463: efficacy and mode of action. **The Journal of infectious diseases**, v. 179, n. 6, p. 1485–1494, 1999.

CALIXTO, B. et al. Naturally occurring antinociceptive substances. v. 418, n. May, p. 401–418, 2000.

CAMUESCO, D. et al. The intestinal anti-inflammatory effect of quercitrin is associated with an inhibition in iNOS expression. **British journal of pharmacology**, v. 143, n. 7, p. 908–18, 2004.

CAÑEDA-GUZMÁN, I. C. et al. NK cell activity differs between patients with localized and diffuse cutaneous leishmaniasis infected with *Leishmania mexicana*: A comparative study of TLRs and cytokines. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, 2014.

CANTANHÊDE, L. M. et al. Further Evidence of an Association between the Presence of *Leishmania RNA Virus 1* and the Mucosal Manifestations in Tegumentary Leishmaniasis Patients. p. 1–11, 2015.

CAO, G.; SOFIC, E.; PRIOR, R. L. Antioxidant and prooxidant behavior of flavonoids: Structure-activity relationships. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 22, n. 5, p. 749–760, 1997.

CARVALHO, A. M. et al. Age modifies the immunologic response and clinical presentation of American tegumentary leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 92, n. 6, p. 1173–1177, 2015.

CARVALHO, E. M. et al. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica**, v. 56, n. 4, p. 315–325, 1994.

CASTELLANI, M. L. et al. Inhibitory effect of quercetin on tryptase and MCP-1 chemokine release, and histidine decarboxylase mRNA transcription by human mast cell-1 cell line. **NeuroImmunoModulation**, v. 13, n. 3, p. 179–186, 2007.

CASTES, M.; TAPIA, F. J. [Immunopathology of American tegumentary leishmaniasis]. **Acta Cient Venez**, v. 49, n. 1, p. 42–56, 1998.

CHAKOUR, R. et al. Both the Fas Ligand and Inducible Nitric Oxide Synthase Are Needed for Control of Parasite Replication within Lesions in Mice Infected with *Leishmania major* whereas the Contribution of Tumor Necrosis Factor Is Minimal Both the Fas Ligand and Inducible Nit. **Infection and immunity**, v. 71, n. 9, p. 5287–5295, 2003.

CHEN, J. et al. Inhibition of iNOS gene expression by quercetin is mediated by the inhibition of I κ B kinase, nuclear factor-kappa B and STAT1, and depends on heme oxygenase-1 induction in mouse BV-2 microglia. v. 521, p. 9–20, 2005.

CHEN, Y. C. et al. Inhibition of nitric oxide synthase inhibitors and lipopolysaccharide induced inducible NOS and cyclooxygenase-2 gene expressions by rutin, quercetin, and

quercetin pentaacetate in RAW 264.7 macrophages. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 82, n. 4, p. 537–548, 2001.

CHEUKA, P. et al. The Role of Natural Products in Drug Discovery and Development against Neglected Tropical Diseases. **Molecules**, v. 22, n. 1, p. 58, 2016.

CHOBOT, V. et al. Pro- and Antioxidant Activity of Three Selected Flavan Type Flavonoids: Catechin, Eriodictyol and Taxifolin. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 12, p. 1986, 2016.

CHOI, J. A et al. Induction of cell cycle arrest and apoptosis in human breast cancer cells by quercetin. **Int J Oncol**, v. 19, n. 4, p. 837–844, 2001.

CHRUSCIAK-TALHARI, A. et al. Randomized Controlled Clinical Trial to Assess Efficacy and Safety of Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania (Viannia) guyanensis* in Manaus, Brazil. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 2, p. 255–260, 2011.

CHUANG, C. et al. Quercetin is equally or more effective than resveratrol in attenuating tumor necrosis factor- α – mediated inflammation and insulin resistance in primary human adipocytes 1 – 3. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 92, n. 6, p. 1511–1521, 2010.

CORTÁZAR, T. M.; COOMBS, G. H.; WALKER, J. *Leishmania panamensis*: Comparative inhibition of nuclear DNA topoisomerase II enzymes from promastigotes and human macrophages reveals anti-parasite selectivity of fluoroquinolones, flavonoids and pentamidine. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 4, p. 475–482, 2007.

COS, P. et al. Structure-activity relationship and classification of flavonoids as inhibitors of xanthine oxidase and superoxide scavengers. **Journal of Natural Products**, v. 61, n. 1, p. 71–76, 1998.

COSTA, D. C. S. DA et al. Oral Manifestations in the American Tegumentary Leishmaniasis. **PLoS ONE**, v. 9, n. 11, p. e109790, 2014.

CROFT, S. L.; COOMBS, G. H. Leishmaniasis - Current chemotherapy and recent advances in the search for novel drugs. **Trends in Parasitology**, v. 19, n. 11, p. 502–508, 2003.

CROFT, S. L.; ENGEL, J. Miltefosine - discovery of the antileishmanial activity of phospholipid derivatives. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 100, n. SUPPL. 1, p. 4–8, 2006.

CROFT, S. L.; OLLIARO, P. Leishmaniasis chemotherapy-challenges and opportunities. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 17, n. 10, p. 1478–1483, 2011.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**, v. 72, p. 132–141, 2002.

DA-CRUZ, A. M. et al. Tumor necrosis factor-alpha in human american tegumentary leishmaniasis. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 91, n. 2, p. 225–229, 1996.

DA SILVA, E. R.; MAQUIAVELI, C. D. C.; MAGALHÃES, P. P. The leishmanicidal flavonols quercetin and quercitrin target *Leishmania (Leishmania) amazonensis* arginase. **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 3, p. 183–188, 2012.

DA SILVA, S. A et al. Therapeutic effect of oral *Kalanchoe pinnata* leaf extract in murine leishmaniasis. **Acta tropica**, v. 60, n. 3, p. 201–10, 1995.

DALY, K. et al. Intermediate cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis* successfully treated with fluconazole. **Clinical and Experimental Dermatology**, v. 39, n. 6, p. 708–712, 2014.

DAMAS, J.; BOURDON, V.; LA-, J. L. PRO-INFLAMMATORY FLAVONOIDS WHICH ARE INHIBITORS OF PROSTAGLANDIN BIOSYNTHESIS . L Bon Fredericq , E-4020 Liege (Belgium)(Reprint request to JD). ABSTRACT Catechin dimers induce a large long-lasting oedema when injected in the paw of the rat . This oe. p. 11–22, 1985.

DAVIS, B. D. Mechanism of bactericidal action of aminoglycosides. **Microbiological reviews**, v. 51, n. 3, p. 341–350, 1987.

DE MENEZES, J. P. B. et al. Advances in development of new treatment for leishmaniasis. **BioMed Research International**, v. 2015, p. 15–18, 2015.

DE SALDANHA, R. R. et al. Meglumine antimonate treatment enhances phagocytosis and TNF- α production by monocytes in human cutaneous leishmaniasis. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 106, n. 10, p. 596–603, 2012.

DE SOUSA, L. R. F. et al. Natural products as inhibitors of recombinant cathepsin L of *Leishmania mexicana*. **Experimental Parasitology**, v. 156, p. 42–48, 2015.

DE TREZ, C. et al. iNOS-producing inflammatory dendritic cells constitute the major infected cell type during the chronic *Leishmania major* infection phase of C57BL/6 resistant mice. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 6, 2009.

DELMASL, F. et al. Antileishmanial Activity of Three Saponins Isolated from Ivy , aa-Hederin , and Hederacolchiside A as Compared to Their Action on Mammalian Cells Cultured in Vitro. **Planta Med.**, v. 66, n. 5, p. 343–347, 2000.

DO NASCIMENTO SIMÕES, V. et al. Síntese, caracterização e estudo das propriedades de um novo complexo mononuclear contendo quercetina e íon Ga(III). **Química Nova**, v. 36, n. 4, p. 495–501, 2013.

DODSON, H. C. et al. NIH Public Access. v. 127, n. 2, p. 423–428, 2012.

DONG, Y.-S. et al. Protective Effect of Quercetin against Oxidative Stress and Brain Edema in an Experimental Rat Model of Subarachnoid Hemorrhage. **International journal of medical sciences**, v. 11, n. 3, p. 282–90, 2014.

DORA, C. L.; SOUZA, L. C. Novas Formas Comerciais De Anfotericina B. v. 14, n. 2, p. 187–197, 2005.

DOROODGAR, M. et al. Tamoxifen induces apoptosis of leishmania major promastigotes in vitro. **Korean Journal of Parasitology**, v. 54, n. 1, p. 9–14, 2016.

DOS REIS, M. B. G. et al. Inhibition of Leishmania (Leishmania) amazonensis and rat arginases by green tea EGCG, (+)-catechin and (-)-epicatechin: A comparative structural analysis of enzyme-inhibitor interactions. **PLoS ONE**, v. 8, n. 11, 2013.

DOS SANTOS, A. O. et al. Leishmania amazonensis: Effects of oral treatment with copaiba oil in mice. **Experimental Parasitology**, v. 129, n. 2, p. 145–151, 2011.

DUTTA, A. et al. In vitro antileishmanial activity of Aloe vera leaf exudate: A potential herbal therapy in leishmaniasis. **Glycoconjugate Journal**, v. 24, n. 1, p. 81–86, 2007a.

DUTTA, A. et al. Aloe vera leaf exudate induces a caspase-independent cell death in Leishmania donovani promastigotes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 5, p. 629–636, 2007b.

DUTTA, A. et al. In vitro and in vivo activity of Aloe vera leaf exudate in experimental visceral leishmaniasis. **Parasitology Research**, v. 102, n. 6, p. 1235–1242, 2008.

DZOYEM, J. P. et al. Anti-inflammatory and anticholinesterase activity of six flavonoids isolated from Polygonum and Dorstenia species. **Archives of Pharmacal Research**, 2015.

EDWARDS, R. L. et al. Quercetin Reduces Blood Pressure in. n. August, p. 2405–2411, 2007.

EGERT, S.; BOESCH-SAADATMANDI, C. Serum lipid and blood pressure responses to quercetin vary in overweight patients by apolipoprotein E genotype. **The Journal of Nutrition**, v. 140, p. 278–284, 2010.

EGHBALIFERIZ, S.; IRANSHAHI, M. Prooxidant Activity of Polyphenols, Flavonoids, Anthocyanins and Carotenoids: Updated Review of Mechanisms and Catalyzing Metals. **Phytotherapy Research**, n. March, p. 1379–1391, 2016.

EIRAS, D. P.; KIRKMAN, L. A.; MURRAY, H. W. Cutaneous Leishmaniasis: Current Treatment Practices in the USA for Returning Travelers. **Current Treatment Options of Infectious Diseases**, v. 7, n. 1, p. 52–62, 2015.

ESFANDIARPOUR, I.; ALAVI, A. Evaluating the efficacy of allopurinol and meglumine antimoniate (Glucantime) in the treatment of cutaneous leishmaniasis. **International Journal of Dermatology**, v. 41, n. 8, p. 521–524, 2002.

FANTINI, M. et al. In vitro and in vivo antitumoral effects of combinations of polyphenols, or polyphenols and anticancer drugs: Perspectives on cancer treatment. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 5, p. 9236–9282, 2015.

FERREIRA, M. E. et al. Leishmanicidal activity of two canthin-6-one alkaloids, two major constituents of *Zanthoxylum chiloperone* var. *angustifolium*. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 80, n. 2–3, p. 199–202, 2002.

FERRINDIZ, M. L.; ALCARAZ, M. J. Anti-inflammatory activity and inhibition of arachidonic acid metabolism by flavonoids. v. 32, p. 0–5, 1991.

FERRIOLA, P. C.; CODY, V.; MIDDLETON, E. PROTEIN KINASE C INHIBITION BY PLANT FLAVONOIDS. v. 38, n. 10, p. 1617–1624, 1989.

FILARDY, A. A. et al. Infection with *Leishmania major* induces a cellular stress response in macrophages. **PLoS ONE**, v. 9, n. 1, 2014.

FONSECA-SILVA, F. et al. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin induced death in *Leishmania amazonensis*. **PLoS ONE**, v. 6, n. 2, 2011.

FONSECA-SILVA, F. et al. Reactive oxygen species production by quercetin causes the death of *Leishmania amazonensis* intracellular amastigotes. **J. Nat. Prod.**, v. 76, p. 1505–1508, 2013.

FONSECA-SILVA, F. et al. Effect of Apigenin on *Leishmania amazonensis* Is Associated with Reactive Oxygen Species Production Followed by Mitochondrial Dysfunction. **Journal of Natural Products**, v. 78, n. 4, p. 880–884, 2015.

FRABASILE, S. et al. The citrus flavanone naringenin impairs dengue virus replication in human cells. **Scientific Reports**, v. 7, p. 41864, 2017.

FRANÇA-COSTA, J. et al. Arginase I, polyamine, and prostaglandin E2 pathways suppress the inflammatory response and contribute to diffuse cutaneous leishmaniasis. **Journal of Infectious Diseases**, v. 211, n. 3, p. 426–435, 2015.

FUMAGALI, E. et al. Revisão tecidos de plantas: O exemplo dos gêneros *Tabernaemontana* e. v. 18, n. August, p. 627–641, 2008.

GADELHA, E. P. N. et al. Efficacy and safety of a single dose pentamidine (7 mg/kg) for patients with cutaneous leishmaniasis caused by *L. guyanensis*: a pilot study. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 90, n. 6, p. 807–813, 2015.

GALDINO, H. et al. *Leishmania (Viannia) braziliensis* amastigotes induces the expression of TNF α and IL-10 by human peripheral blood mononuclear cells in vitro in a TLR4-dependent manner. **Cytokine**, v. 88, p. 184–192, 2016.

GARDI, C. et al. Quercetin reduced inflammation and increased antioxidant defense in rat adjuvant arthritis. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 583, p. 150–157, 2015.

GAWLIK, M. et al. Manganese neurotoxicity and protective effects of resveratrol and quercetin in preclinical research. **Pharmacological Reports**, v. 69, n. 2, p. 322–330, 2017.

GHAZANFARI, T. et al. Garlic induces a shift in cytokine pattern in *Leishmania major*-infected BALB/c mice. **Scandinavian Journal of Immunology**, v. 52, n. 5, p. 491–495, 2000.

GHAZANFARI, T.; HASSAN, Z. M.; KHAMESIPOUR, A. Enhancement of peritoneal macrophage phagocytic activity against *Leishmania major* by garlic (*Allium Sativum*) treatment. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 103, n. 3, p. 333–337, 2006.

GIBELLINI, L. et al. Interfering with ROS metabolism in cancer cells: The potential role of quercetin. **Cancers**, v. 2, n. 2, p. 1288–1311, 2010.

GIL-CARDOSO, K. et al. Effects of flavonoids on intestinal inflammation, barrier integrity and changes in gut microbiota during diet-induced obesity. **Nutrition research reviews**, p. 1–15, 2016.

GINOUVÈS, M. et al. Prevalence and distribution of leishmania RNA virus 1 in leishmania parasites from French Guiana. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 94, n. 1, p. 102–106, 2016.

GOLLOB, K. J.; VIANA, A. G.; DUTRA, W. O. Immunoregulation in Human American Leishmaniasis: Balancing Pathology and Protection. v. 148, n. 6, p. 895–901, 2014.

GOMES-SILVA, A. et al. T-cell responses associated with resistance to *Leishmania* infection in individuals from endemic areas for *Leishmania (Viannia) braziliensis*. v. 102, n. August, p. 625–630, 2007.

GOMES-SILVA, A. et al. Golden hamster (*Mesocricetus auratus*) as an experimental model for *Leishmania (Viannia) braziliensis* infection. **Parasitology**, v. 140, n. 6, p. 771–9, 2013.

GOMES, A. H. S. et al. American cutaneous leishmaniasis: In situ immune response of patients with recent and late lesions. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 38, n. 1, p. 42–49, 2016.

GOMES, C. B. et al. Increasing in cysteine proteinase B expression and enzymatic activity during in vitro differentiation of *Leishmania (Viannia) braziliensis*: First evidence of modulation during morphological transition. **Biochimie**, v. 133, p. 28–36, 2017.

GOMES, D. C. O.; MUZITANO, M. F.; COSTA, S. S. Effectiveness of the immunomodulatory extract of *Kalanchoe pinnata* against murine visceral leishmaniasis. p. 613–618, 2010.

GONZALEZ-FAJARDO, L. et al. Ex Vivo Host and Parasite Response to Antileishmanial Drugs and Immunomodulators. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 5, p. e0003820, 2015.

GORMAZ, J. G.; QUINTREMIL, S.; RODRIGO, R. Cardiovascular Disease: A Target for the Pharmacological Effects of Quercetin. p. 1735–1742, 2015.

GOTO, H.; LINDOSO, J. A. L. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert review of anti-infective therapy**, v. 8, n. 4, p. 419–433, 2010.

GRECCO, S. D. S. et al. In vitro antileishmanial and antitrypanosomal activities of flavanones from *Baccharis retusa* DC. (Asteraceae). **Experimental Parasitology**, v. 130, n. 2, p. 141–145, 2012.

GREGORY, D. J.; OLIVIER, M. Subversion of host cell signalling by the protozoan parasite *Leishmania*. **Parasitology**, v. 130 Suppl, p. S27–S35, 2005.

GROGL, M. A. X.; THOMASON, T. N.; FRANKE, E. D. SYSTEMIC CHEMOTHERAPY OF CUTANEOUS AND MUCOCUTANEOUS DISEASE. v. 47, n. 1, p. 117–126, 1992.

GUARDIA, T. et al. Anti-inflammatory properties of plant flavonoids. Effects of rutin, quercetin and hesperidin on adjuvant arthritis in rat. **Farmaco**, v. 56, n. 9, p. 683–687, 2001.

GUIMARÃES-COSTA, A. B. et al. *Leishmania amazonensis* promastigotes induce and are killed by neutrophil extracellular traps. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 106, n. 16, p. 6748–6753, 2009.

GUIMARÃES, L. H. et al. Aspectos Clínicos da Leishmaniose Tegumentar Clinical Aspects of Tegumentary Leishmaniasis. v. 1, n. 1, p. 66–74, 2005.

GUIMARÃES, L. H. et al. Atypical Manifestations of Cutaneous Leishmaniasis in a Region Endemic for *Leishmania braziliensis*: Clinical, Immunological and Parasitological Aspects. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 12, p. e0005100, 2016.

HALEAGRAHARA, N. et al. Therapeutic effect of quercetin in collagen-induced arthritis. **Biomedicine & Pharmacotherapy**, v. 90, p. 38–46, 2017.

HALLIDAY, A. et al. Toll-like receptor 2 (TLR2) plays a role in controlling cutaneous leishmaniasis in vivo, but does not require activation by parasite lipophosphoglycan. **Parasites & Vectors**, v. 9, n. 1, p. 532, 2016.

HARTLEY, M. et al. *Leishmania* RNA virus : when the host pays the toll. v. 2, n. July, p. 1–15, 2012.

HARVEY, A. L. Natural products in drug discovery. **Drug Discovery Today**, v. 13, n. 19–20, p. 894–901, 2008.

HARWOOD, M. et al. A critical review of the data related to the safety of quercetin and lack of evidence of in vivo toxicity, including lack of genotoxic/carcinogenic properties. **Food and Chemical Toxicology**, v. 45, n. 11, p. 2179–2205, 2007.

HEEBA, G. H.; MAHMOUD, M. E.; HANAFY, A. A. EL. Anti-inflammatory potential of curcumin and quercetin in rats. **Toxicology and Industrial Health**, v. 30, n. 6, p. 551–560, 2014.

HEINZEL, F. P. et al. Increased capacity for interleukin-2 synthesis parallels disease progression in mice infected with *Leishmania major*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 9, p. 4537–4540, 1998.

HENARD, C. A. et al. *Leishmania amazonensis* Amastigotes Highly Express a Tryparedoxin Peroxidase Isoform That Increases Parasite Resistance to Macrophage Antimicrobial Defenses and Fosters Parasite Virulence. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, 2014.

HENDRICKX, S. et al. Experimental selection of paromomycin and miltefosine resistance in intracellular amastigotes of *Leishmania donovani* and *L. infantum*. **Parasitology Research**, v. 113, n. 5, p. 1875–1881, 2014.

HERTOG, G. L. et al. and Vegetable Consumption Caerphilly and Study ' Cancer Mortality in the. v. 5, p. 673–677, 1996.

HIRANO, T.; NAKAJIMA, K.; HIBI, M. Signaling Mechanisms Through gp130: A Model of the Cytokine System Toshio Hirano,* Koichi Nakajima and Masahiko Hibi. v. 6101, n. 4, 1998.

HOLLMAN, P. C. H. Human Nutrition and Metabolism Quercetin Glucuronides but Not Glucosides Are Present in Human Plasma after Consumption of Quercetin-3-Glucoside or. p. 1938–1941, 2001.

HOLLOWKA, T. et al. *Leishmania*-encoded orthologs of macrophage migration inhibitory factor regulate host immunity to promote parasite persistence. **FASEB Journal**, v. 30, n. 6, p. 2249–2265, 2016.

HOULISTON, R. A.; PEARSON, J. D.; WHEELER-JONES, C. P. Agonist-specific cross talk between ERKs and p38(mapk) regulates PGI(2) synthesis in endothelium. **American journal of physiology. Cell physiology**, v. 281, n. 4, p. C1266-76, 2001.

HUEBBE, P. et al. Effect of dietary quercetin on brain quercetin levels and the expression of antioxidant and Alzheimer's disease relevant genes in mice. **Pharmacological Research**, v. 61, n. 3, p. 242–246, 2010.

HURRELL, B. P.; REGLI, I. B.; TACCHINI-COTTIER, F. Different *Leishmania* Species Drive Distinct Neutrophil Functions. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 5, p. 392–401, 2016.

HUSSAIN, T. et al. Health-promoting properties of *eucommia ulmoides*: A review. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2016, 2016.

INACIO, J. D. F. et al. In Vitro and in Vivo Effects of (-)-Epigallocatechin 3-O-gallate on *Leishmania amazonensis*. p. 0–3, 2013.

INACIO, J. D. F. et al. The Effect of (-)-Epigallocatechin 3-O-Gallate In Vitro and In Vivo in *Leishmania braziliensis*: Involvement of Reactive Oxygen Species as a Mechanism of Action. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 8, p. e3093, 2014.

ISLAMUDDIN, M. et al. Leishmanicidal activities of *Artemisia annua* leaf essential oil against Visceral Leishmaniasis. **Frontiers in Microbiology**, v. 5, n. November, p. 1–15, 2014.

ISLAMUDDIN, M. et al. Th1-Biased Immunomodulation and Therapeutic Potential of *Artemisia annua* in Murine Visceral Leishmaniasis. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 1, p. e3321, 2015.

ISNARD, A.; SHIO, M. T.; OLIVIER, M. Impact of *Leishmania* metalloprotease GP63 on macrophage signaling. **Frontiers in cellular and infection microbiology**, v. 2, n. May, p. 72, 2012.

ITO, M. M. et al. Correlation between presence of *Leishmania* RNA virus 1 and clinical characteristics of nasal mucosal leishmaniasis. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 81, n. 5, p. 533–540, 2015.

IVES, A. et al. *Leishmania* RNA Virus Controls the Severity of Mucocutaneous Leishmaniasis. v. 331, n. 6018, p. 775–778, 2012.

JAIN, R. et al. *Leishmania* cell surface prohibitin: Role in host-parasite interaction. **Cellular Microbiology**, v. 12, n. 4, p. 432–452, 2010.

JEAN-MORENO, V. et al. *Leishmania donovani*: Differential activities of classical topoisomerase inhibitors and antileishmanials against parasite and host cells at the level of DNA topoisomerase I and in cytotoxicity assays. **Experimental Parasitology**, v. 112, n. 1, p. 21–30, 2006.

JHINGRAN, A. et al. Paromomycin: Uptake and resistance in *Leishmania donovani*. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 164, n. 2, p. 111–117, 2009.

Ji, J. et al. QUERCETIN: A POTENTIAL NATURAL DRUG FOR ADJUVANT TREATMENT OF RHEUMATOID ARTHRITIS 418 Jian-Jun Ji. v. 10, p. 418–421, 2013.

JOHNSON, G. L.; LAPADAT, R. Mitogen-Activated Protein Kinase Pathways Mediated by ERK , JNK , and p38 Protein Kinases Author (s): Gary L . Johnson and Razvan Lapadat Published by: American Association for the Advancement of Science Stable URL : <http://www.jstor.org/stable/3833110>. v. 298, n. 5600, p. 1911–1912, 2013.

JONES, D. et al. Differential regulation of the interleukin-12 receptor during the innate immune response to *Leishmania major*. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 8, p. 3818–3824, 1998.

JUNIOR, C. O. R. et al. Synthesis of genistein coupled with sugar derivatives and their inhibitory effect on nitric oxide production in macrophages. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 85, p. 615–620, 2014.

KAISER, M. et al. Antiprotozoal activity profiling of approved drugs: A starting point toward drug repositioning. **PLoS ONE**, v. 10, n. 8, p. 1–16, 2015.

KANALY, S. T. et al. TNF receptor p55 is required for elimination of inflammatory cells following control of intracellular pathogens. **J Immunol**, v. 163, n. 7, p. 3883–3889, 1999.

KARP, C. L.; JENKINS, M. K.; SACKS, D. L. chronic *Leishmania major* infection in resistant mice. v. 43, n. 2, p. 427–438, 2014.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. **Nature reviews. Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011.

KHALILI, G. et al. Immunotherapy with Imiquimod Increases the Efficacy of Glucantime Therapy of *Leishmania major* Infection. **Iranian Journal of Immunology**, v. 8, n. 1, p. 45–51, 2011.

KHARE, P. et al. Immunoprotective responses of T helper type 1 stimulatory protein-S-adenosyl-L-homocysteine hydrolase against experimental visceral leishmaniasis. **Clinical and Experimental Immunology**, v. 185, n. 2, p. 165–179, 2016.

KHAZAELI, P. et al. Anti-leishmanial effect of itraconazole niosome on in vitro susceptibility of *Leishmania tropica*. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, v. 38, n. 1, p. 205–211, 2014.

KHEIRANDISH, F. et al. Antileishmanial, antioxidant, and cytotoxic activities of *Quercus infectoria* Olivier extract. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 82, p. 208–215, 2016.

KHURANA, S. et al. Polyphenols: Benefits to the cardiovascular system in health and in aging. **Nutrients**, v. 5, n. 10, p. 3779–3827, 2013.

KIM, H. K. et al. Effects of Naturally Occurring Flavonoids on Nitric Oxide Production in the Macrophage Cell Line RAW 264 . 7 and Their Structure – Activity Relationships. **Science**, v. 58, n. 99, p. 759–765, 1999.

KIM, H. P. et al. Anti-inflammatory plant flavonoids and cellular action mechanisms. **Journal of pharmacological sciences**, v. 96, n. 3, p. 229–45, 2004.

KIMA, P. E. et al. Identification of *Leishmania* proteins preferentially released in infected cells using change mediated antigen technology (CMAT). **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 10, 2010.

KOBORI, M. et al. Quercetin suppresses immune cell accumulation and improves mitochondrial gene expression in adipose tissue of diet-induced obese mice. **Molecular nutrition & food research**, v. 60, n. 2, p. 300–312, 2016.

KUMAR, A. et al. A new bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from *Thalictrum foliolosum*, as a potent inhibitor of DNA topoisomerase IB of *Leishmania donovani*. **Fitoterapia**, v. 109, p. 25–30, 2016.

LAMIE, P. F. et al. Novel N-substituted indole Schiff bases as dual inhibitors of cyclooxygenase-2 and 5-lipoxygenase enzymes: Synthesis, biological activities in vitro and docking study. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 123, p. 803–813, 2016.

LAWRENCE, T. Inflammation. p. 1–10, 2009.

LEE, C. S. et al. Quercetin-3-O-(2,4,6-tri-O-galloyl)- β -D-glucopyranoside inhibits TNF- α -activated NF- κ B-induced inflammatory mediator production by suppressing ERK activation. **International Immunopharmacology**, v. 16, n. 4, p. 481–487, 2013.

LESSA, H. A. et al. Successful treatment of refractory mucosal leishmaniasis with pentoxifylline plus antimony. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 65, n. 2, p. 87–89, 2001.

LEYVA-LÓPEZ, N. et al. Flavonoids as cytokine modulators: A possible therapy for inflammation-related diseases. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 17, n. 6, 2016.

LIAO, W. et al. Priming for T helper type 2 differentiation by interleukin 2- mediated induction of IL-4 receptor α chain expression. **Nature Immunology**, v. 9, n. 11, p. 1288–1296, 2009.

LIAO, W. et al. Cytokine receptor modulation by interleukin-2 broadly regulates T helper cell lineage differentiatio. **Nat Immunol**, v. 12, n. 6, p. 551–559, 2011.

LIAO, Y.; LIN, J. Quercetin intraperitoneal administration ameliorates lipopolysaccharide-induced systemic inflammation in mice. **Life Sciences**, v. 137, p. 89–97, 2015.

LIESE, J.; SCHLEICHER, U.; BOGDAN, C. TLR9 signaling is essential for the innate NK cell response in murine cutaneous leishmaniasis. **European Journal of Immunology**, v. 37, n. 12, p. 3424–3434, 2007.

LIEW, F. Y.; WEI, X. Q.; PROUDFOOT, L. Cytokines and nitric oxide as effector molecules against parasitic infections. **Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences**, v. 352, n. 1359, p. 1311–1315, 1997.

LIM, W. et al. Inhibitory Effects of Quercetin on Progression of Human Choriocarcinoma Cells Are Mediated Through PI3K/AKT and MAPK Signal Transduction Cascades. **Journal of Cellular Physiology**, v. 232, n. 6, p. 1428–1440, 2017.

LIMA, H. C.; BLEYENBERG, J. A.; TITUS, R. G. A simple method for quantifying Leishmania in tissues of infected animals. **Parasitology Today**, v. 13, n. 2, p. 80–82, 1997.

LIN, H. Y.; CHANG, S. T. Kaempferol glycosides from the twigs of *Cinnamomum osmophloeum* and their nitric oxide production inhibitory activities. **Carbohydrate Research**, v. 364, p. 49–53, 2012.

LIN, X. et al. Quercetin protects against heat stroke-induced myocardial injury in male rats: Antioxidative and antiinflammatory mechanisms. **Chemico-Biological Interactions**, v. 265, p. 47–54, 2017.

LIU, K. Y. et al. Tests of pattern separation and pattern completion in humans – a systematic review. **Hippocampus**, v. 00, n. December 2015, p. 2–31, 2015.

LOCKSLEY, R. M.; SCOTT, P. Helper T-cell subsets in mouse leishmaniasis: induction, expansion and effector function. **Immunology Today**, v. 12, n. 3, p. 58–61, 1991.

LOPEZ KOSTKA, S. et al. IL-17 promotes progression of cutaneous leishmaniasis in susceptible mice. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 182, n. 5, p. 3039–46, 2009.

LORÍA-CERVERA, E. N.; ANDRADE-NARVÁEZ, F. J. Animal models for the study of leishmaniasis immunology. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 56, n. 1, p. 1–11, 2014.

M NASSERI AND F. Z. MODABBERI. Generalized Infection and Lack of Delayed Hypersensitivity in BALB / c Mice Infected with Leishmania tropical Major. v. 26, n. 2, p. 611–614, 1979.

MA, X. et al. Regulation of IL-10 and IL-12 production and function in macrophages and dendritic cells. **F1000Research**, v. 4, n. 31370903, p. 1–13, 2015.

MACHADO, P. R. et al. Miltefosine in the Treatment of Cutaneous Leishmaniasis Caused by Leishmania braziliensis in Brazil: A Randomized and Controlled Trial. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 12, p. e912, 2010.

MAKINO, T. et al. Anti-allergic effects of enzymatically modified isoquercitrin (??-oligoglucosyl quercetin 3-O-glucoside), quercetin 3-O-glucoside, ??-oligoglucosyl rutin, and quercetin, when administered orally to mice. **Journal of Natural Medicines**, v. 67, n. 4, p. 881–886, 2013.

MAMANI-MATSUDA, M. et al. Quercetin Induces Apoptosis of Trypanosoma brucei gambiense and Decreases the Proinflammatory Response of Human Macrophages. **Society**, v. 48, n. 3, p. 924–929, 2004.

MAMANI-MATSUDA, M. et al. Therapeutic and preventive properties of quercetin in experimental arthritis correlate with decreased macrophage inflammatory mediators. **Biochemical Pharmacology**, v. 72, n. 10, p. 1304–1310, 2006.

MANACH, C. et al. Bioavailability of rutin and quercetin in rats. **FEBS Letters**, v. 409, n. 1, p. 12–16, 1997.

MANNA, L. et al. Long-term follow-up of dogs with leishmaniosis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol. **Parasites & Vectors**, v. 8, n. 1, p. 289, 2015.

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

MARINA, M. et al. Quercetin ameliorates experimental autoimmune myocarditis in rats. **Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences**, v. 13, n. 3, p. 311–319, 2010.

MARTÍNEZ-LÓPEZ, M. et al. Batf3-dependent CD103⁺ dendritic cells are major producers of IL-12 that drive local Th1 immunity against *Leishmania major* infection in mice. **European Journal of Immunology**, v. 45, n. 1, p. 119–129, 2015.

MARUNAKA, Y. et al. Actions of Quercetin, a Polyphenol, on Blood Pressure. **Molecules**, v. 22, n. 2, p. 209, 2017.

MASCARAQUE, C. et al. Rutin has intestinal antiinflammatory effects in the CD4⁺ CD62L⁺ T cell transfer model of colitis. **Pharmacological Research**, v. 90, p. 48–57, 2014.

MASPI, N.; ABDOLI, A.; GHAFARIFAR, F. Pro- and anti-inflammatory cytokines in cutaneous leishmaniasis: a review. **Pathogens and Global Health**, v. 110, n. 6, p. 247–260, 2016.

MATTE, C.; OLIVIER, M. Leishmania-induced cellular recruitment during the early inflammatory response: modulation of proinflammatory mediators. **The Journal of infectious diseases**, v. 185, n. 5, p. 673–81, 2002.

MAY, Q. et al. QUERCETIN MAY ACT AS A CYTOTOXIC PROOXIDANT AFTER ITS. v. 26, n. 98, p. 107–116, 1999.

MCGWIRE, B. S.; SATOSKAR, A. R. Leishmaniasis: Clinical syndromes and treatment. **Qjm**, v. 107, n. 1, p. 7–14, 2014.

MEARS, E. R. et al. A Review: The Current In Vivo Models for the Discovery and Utility of New Anti-leishmanial Drugs Targeting Cutaneous Leishmaniasis. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, p. e0003889, 2015.

MELBY, P. C. et al. Cloning of Syrian Hamster (*Mesocricetus auratus*) Cytokine cDNAs and Analysis of Cytokine mRNA Expression in Experimental Visceral Leishmaniasis Cloning of Syrian Hamster (*Mesocricetus auratus*) Cytokine cDNAs and Analysis of Cytokine mRNA Expression in. **Infection and Immunity**, v. 66, n. 5, p. 2135–2142, 1998.

MELBY, P. C. et al. 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. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 166, p. 1912–1920, 2001.

MENDONC, R. R. et al. Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from. **Society**, v. 47, n. 6, p. 1895–1901, 2003.

MENDONÇA, S. C. et al. Human american cutaneous leishmaniasis (*Leishmania b. braziliensis*) in Brazil: lymphoproliferative responses and influence of therapy. **Clinical and experimental immunology**, v. 64, n. 2, p. 269–76, 1986.

MENG, F. et al. Synergistic effects of snail and quercetin on renal cell carcinoma Caki-2 by altering AKT / mTOR / ERK1 / 2 signaling pathways. v. 8, n. 6, p. 6157–6168, 2015.

MICHAUD-LEVESQUE, J.; BOUSQUET-GAGNON, N.; BÉLIVEAU, R. Quercetin abrogates IL-6 / STAT3 signaling and inhibits glioblastoma cell line growth and migration. **Experimental Cell Research**, v. 318, n. 8, p. 925–935, 2012.

MIGUEL, D. C. et al. Tamoxifen is effective against Leishmania and induces a rapid alkalinization of parasitophorous vacuoles harbouring Leishmania (Leishmania) amazonensis amastigotes. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 60, n. 3, p. 526–534, 2007.

MIGUEL, D. C. et al. Tamoxifen as a potential antileishmanial agent: Efficacy in the treatment of Leishmania braziliensis and Leishmania chagasi infections. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 63, n. 2, p. 365–368, 2009.

MIGUEL, D. C. et al. Clinical isolates of New World Leishmania from cutaneous and visceral leishmaniasis patients are uniformly sensitive to tamoxifen. **International Journal of Antimicrobial Agents**, v. 38, n. 1, p. 93–94, 2011.

MIGUEL, D. C.; YOKOYAMA-YASUNAKA, J. K. U.; ULIANA, S. R. B. Tamoxifen is effective in the treatment of Leishmania amazonensis infections in mice. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 2, n. 6, 2008.

MIKI, H. et al. Resveratrol induces apoptosis via ROS-triggered autophagy in human colon cancer cells. **International Journal of Oncology**, v. 40, n. 4, p. 1020–1028, 2012.

MILENKOVIĆ, M. et al. Quercetin ameliorates experimental autoimmune myocarditis in rats. **Journal of pharmacy & pharmaceutical sciences : a publication of the Canadian Society for Pharmaceutical Sciences, Société canadienne des sciences pharmaceutiques**, v. 13, n. 3, p. 311–9, 2010.

MISHRA, J.; SAXENA, A.; SINGH, S. Chemotherapy of Leishmaniasis : Past , present and future Chemotherapy of Leishmaniasis : Past , Present and Future. n. August 2015, 2012.

MITTRA, B. et al. Luteolin, an abundant dietary component is a potent anti-leishmanial agent that acts by inducing topoisomerase II-mediated kinetoplast DNA cleavage leading to apoptosis. **Molecular medicine (Cambridge, Mass.)**, v. 6, n. 6, p. 527–541, 2000.

MOAFI, M. et al. Comparison of pro-inflammatory cytokines of non-healing and healing cutaneous Leishmaniasis. **International Journal of Laboratory Hematology**, v. 38, n. 1, p. 42–49, 2016.

MOHRS, M. et al. Differences Between IL-4- and IL-4 Receptor {alpha}-Deficient Mice in Chronic Leishmaniasis Reveal a Protective Role for IL-13 Receptor Signaling. **J Immunol**, v. 162, n. 12, p. 7302–7308, 1999.

MONGE-MAILLO, B.; LOPEZ-VELEZ, R. Therapeutic Options for Old World Cutaneous Leishmaniasis and New World Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis. p. 1889–1920, 2013.

MONGE-MAILLO, B.; LOPEZ-VELEZ, R. Miltefosine for Visceral and Cutaneous Leishmaniasis: Drug Characteristics and Evidence-Based Treatment Recommendations. **Clinical Infectious Diseases**, v. 60, p. 1398–1404, 2015.

MONTRIEUX, E. et al. In vitro and in vivo activity of major constituents from *Pluchea carolinensis* against *Leishmania amazonensis*. **Parasitology Research**, v. 113, n. 8, p. 2925–2932, 2014.

MORAIS, C. V. DE et al. The Dialogue of the Host-Parasite Relationship : *Leishmania* spp . and *Trypanosoma cruzi* Infection. v. 2015, 2015.

MOSMANN, T. R. et al. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 136, n. 7, p. 2348–57, 1986.

MOURA, T. R. DE et al. Toward a Novel Experimental Model of Infection To Study American Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis* Toward a Novel Experimental Model of Infection To Study American Cutaneous Leishmaniasis Caused by *Leishmania braziliensis*. **Infect. Immun.**, v. 73, n. 9, p. 5827–5834, 2005.

MUKHERJEE, A. K. et al. Amphotericin B regulates the host immune response in visceral leishmaniasis: Reciprocal regulation of protein kinase C isoforms. **Journal of Infection**, v. 61, n. 2, p. 173–184, 2010.

MUKHERJEE, S. et al. Imipramine Is an Orally Active Drug against Both Antimony Sensitive and Resistant *Leishmania donovani* Clinical Isolates in Experimental Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 12, 2012.

MUNIZ-JUNQUEIRA, M. I.; DE PAULA-COELHO, V. N. Meglumine antimonate directly increases phagocytosis, superoxide anion and TNF- α production, but only via TNF- α it indirectly increases nitric oxide production by phagocytes of healthy individuals, in vitro. **International Immunopharmacology**, v. 8, n. 12, p. 1633–1638, 2008.

MURAILLE, E. et al. Genetically Resistant Mice Lacking MyD88-Adapter Protein Display a High Susceptibility to *Leishmania* major Infection Associated with a Polarized Th2 Response. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 8, p. 4237–4241, 2003.

MURBACK, N. D. N. et al. American cutaneous leishmaniasis: clinical, epidemiological and laboratory studies conducted at a university teaching hospital in Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil. **Anais brasileiros de dermatologia**, v. 86, n. 1, p. 55–63, 2011.

MUROTA, K.; TERAOKA, J. Antioxidative flavonoid quercetin: implication of its intestinal absorption and metabolism. v. 417, p. 12–17, 2003.

MURRAY, H. W. et al. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561–1577, 2005.

MUTHIAN, G.; BRIGHT, J. J. Quercetin, a Flavonoid Phytoestrogen, Ameliorates Experimental Allergic Encephalomyelitis by Blocking IL-12 Signaling Through JAK-STAT Pathway in T Lymphocyte. **Journal of Clinical Immunology**, v. 24, n. 5, p. 542–552, 2004.

MUZITANO, M. F. et al. Quercitrin: An antileishmanial flavonoid glycoside from *Kalanchoe pinnata*. **Planta Medica**, v. 72, n. 1, p. 81–83, 2006.

MUZITANO, M. F. et al. Oral metabolism and efficacy of *Kalanchoe pinnata* flavonoids in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **Planta Medica**, v. 75, n. 4, p. 307–311, 2009a.

MUZITANO, M. F. et al. Oral Metabolism and Efficacy of *Kalanchoe pinnata* Flavonoids in a Murine Model of Cutaneous Leishmaniasis. p. 307–311, 2009b.

NAIFF, R. D.; TALHARI, S.; BARRET, T. V. **Isolation of *Leishmania guyanensis* from lesions of the nasal mucosa**, 1988.

NAIR, M. P. et al. The Flavonoid Quercetin Inhibits Proinflammatory Cytokine (Tumor Necrosis Factor Alpha) Gene Expression in Normal Peripheral Blood Mononuclear Cells via Modulation of the NF- κ B System. v. 13, n. 3, p. 319–328, 2006.

NAKAMURA, C. V. et al. Copaiba oil: An alternative to development of new drugs against leishmaniasis. **Evidence-based Complementary and Alternative Medicine**, v. 2012, 2012.

NAKAZAWA, H.; GENKA, C.; FUJISHIMA, M. **Pathological aspects of active oxygens/free radicals.***The Japanese journal of physiology*, 1996.

NANDAN, D. et al. Identification of leishmania fructose-1,6-bisphosphate aldolase as a novel activator of host macrophage Src homology 2 domain containing protein tyrosine phosphatase SHP-1. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 364, n. 3, p. 601–607, 2007.

NASHLEANAS, M.; SCOTT, P. Activated T Cells Induce Macrophages To Produce NO and Control *Leishmania major* in the Absence of Tumor Necrosis Factor Receptor p55 Activated T Cells Induce Macrophages To Produce NO and Control *Leishmania major* in the Absence of Tumor Necrosis Factor Re. **Society**, v. 68, n. 3, p. 1428–1434, 2000.

NERLAND, D. E. The antioxidant/electrophile response element motif. **Drug metabolism reviews**, v. 39, n. 1, p. 235–48, 2007.

NEUBER, H. Leishmaniasis. **Journal der Deutschen Dermatologischen Gesellschaft**, v. 6, n. 9, p. 754–765, 2008.

NGUYEN, T. T. T. et al. The role of activated MEK-ERK pathway in quercetin-induced growth inhibition and apoptosis in A549 lung cancer cells. **Carcinogenesis**, v. 25, n. 5, p. 647–659, 2004.

NIEMINEN, R. et al. Anti-Inflammatory Effects of Flavonoids : Genistein , Kaempferol , Quercetin , and Daidzein Inhibit STAT-1 and NF- κ B Activations , Whereas Flavone , Isorhamnetin , Naringenin , and Pelargonidin Inhibit only NF- κ B Activation along with Their Inhibitory. v. 2007, 2007.

NIJVELDT, R. J., VAN NOOD, E. L. S., VAN HOORN, D. E., BOELENS, P. G., VAN NORREN, K., & VAN LEEUWEN, P. A. Flavonoids : a review of probable mechanism of action and potential applications. **The American journal of clinical nutrition**, v. 74, n. 4, p. 418–425, 2001.

NONATO, W. et al. Cytokine The role of inflammatory and anti-inflammatory cytokines in the pathogenesis of human tegumentary leishmaniasis. **Cytokine**, v. 66, n. 2, p. 127–132, 2007.

NOUR, A. M. M. et al. The antiprotozoal activity of methylated flavonoids from *Ageratum conyzoides* L. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 129, n. 1, p. 127–130, 2010.

OGHUMU, S. et al. Transgenic Expression of CXCR3 on T Cells Enhances Susceptibility to Cutaneous *Leishmania major* Infection by Inhibiting Monocyte Maturation and Promoting a Th2 Response. **Infection and Immunity**, v. 83, n. 1, p. 67–76, 2015.

OLIVEIRA-SILVA, F. DE; MORAIS-TEIXEIRA, E. DE; RABELLO, A. Antileishmanial Activity of Azithromycin Against *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Leishmania (Viannia) braziliensis*, and *Leishmania (Leishmania) chagasi*. v. 78, n. 5, p. 745–749, 2008.

OLIVEIRA, P. R. S. et al. *IL2RA* Genetic Variants Reduce IL-2–Dependent Responses and Aggravate Human Cutaneous Leishmaniasis. **The Journal of Immunology**, v. 194, n. 6, p. 2664–2672, 2015.

ORYAN, A.; AKBARI, M. Worldwide risk factors in leishmaniasis. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 9, n. 10, p. 925–932, 2016.

OSORIO, L. E.; CASTILLO, C. M.; OCHOA, M. T. Mucosal Leishmaniasis due to *Leishmania (Viannia) panamensis* in colombia: Clinical characteristics. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 59, n. 1, p. 49–52, 1998.

PAIK, D. et al. ScienceDirect Protective in inflammatory response against visceral leishmaniasis with potato tuber extract: A new approach of successful therapy. **Biomedicine et Pharmacotherapy**, v. 83, p. 1295–1302, 2016.

PAKPOUR, N.; ZAPH, C.; SCOTT, P. The central memory CD4+ T cell population generated during *Leishmania major* infection requires IL-12 to produce IFN-gamma. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 180, n. 12, p. 8299–305, 2008.

PALIT, P.; ALI, N. Oral therapy with sertraline, a selective serotonin reuptake inhibitor, shows activity against *Leishmania donovani*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 5, p. 1120–1124, 2008.

PARIS, C. et al. Miltefosine Induces Apoptosis-Like Death in *Leishmania donovani* Promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 48, n. 3, p. 852–859, 2004.

PARK, A. Y. et al. The Role of IL-12 in Maintaining Resistance to *Leishmania major*. **The Journal of Immunology**, v. 168, n. 11, p. 5771–5777, 2002.

PARK, A. Y.; HONDOWICZ, B. D.; SCOTT, P. Infection *Leishmania major* Response During IL-12 Is Required to Maintain a Th1 IL-12 Is Required to Maintain a Th1 Response During *Leishmania major* Infection. **J Immunol References Bibliotheque Universitaire de Medecine on**, v. 165, p. 896–902, 2000.

PASSERO, F. et al. Plants Used in Traditional Medicine: Extracts and Secondary Metabolites Exhibiting Antileishmanial Activity. *Plants Used in Traditional Medicine: Extracts and Secondary Metabolites Exhibiting Antileishmanial Activity*. n. August 2015, 2012.

PATTERSON, S. et al. The anti-tubercular drug delamanid as a potential oral treatment for visceral leishmaniasis. *eLife*, v. 5, n. MAY2016, p. 1–21, 2016.

PEREZ-FRANCO, J. E. et al. Clinical and Parasitological Features of Patients with American Cutaneous Leishmaniasis that Did Not Respond to Treatment with Meglumine Antimoniate. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 10, n. 5, p. 1–13, 2016.

PETERS, N. C. . et al. In Vivo Imaging Reveals an Essential. v. 321, n. December, p. 970–975, 2008.

PIRMEZ, C. et al. Cytokine patterns in the pathogenesis of human Leishmaniasis. *Journal of Clinical Investigation*, v. 91, n. 4, p. 1390–1395, 1993.

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. Leishmania and the macrophage: a multifaceted interaction. *Future microbiology*, v. 10, n. 1, p. 111–29, 2015.

PONTE, C. B. et al. Miltefosine enhances phagocytosis but decreases nitric oxide production by peritoneal macrophages of C57BL/6 mice. *International Immunopharmacology*, v. 13, n. 1, p. 114–119, 2012.

PRATHEESHKUMAR, P. et al. Luteolin inhibits Cr(VI)-induced malignant cell transformation of human lung epithelial cells by targeting ROS mediated multiple cell signaling pathways. *Toxicology and Applied Pharmacology*, v. 281, n. 2, p. 230–241, 2014.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOU, I.; WILHELMOVÁ, N. Fitoterapia Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids ☆. v. 82, n. 524, p. 513–523, 2011.

PROCHÁZKOVÁ, D.; BOUŠOVÁ, I.; WILHELMOVÁ, N. Antioxidant and prooxidant properties of flavonoids. *Fitoterapia*, v. 82, n. 4, p. 513–523, 2011.

PROVERBIO, D. et al. Proteinuria reduction after treatment with miltefosine and allopurinol in dogs naturally infected with leishmaniasis. *Veterinary World*, v. 9, n. 8, p. 904–908, 2016.

QURESHI, A. A et al. Inhibition of nitric oxide in LPS-stimulated macrophages of young and senescent mice by δ -tocotrienol and quercetin. *Lipids in Health and Disease*, v. 10, n. 1, p. 239, 2011.

RADWANSKA, M. et al. Deletion of IL-4R α on CD4 T Cells Renders BALB/c Mice Resistant to Leishmania major Infection. *PLoS Pathogens*, v. 3, n. 5, p. e68, 2007.

RAFIQ, R. A. et al. A Potent Inhibitor of Phosphoinositide 3-Kinase (PI3K) and Mitogen Activated Protein (MAP) Kinase Signalling, Quercetin (3, 3', 4', 5, 7-Pentahydroxyflavone) Promotes Cell Death in Ultraviolet (UV)-B-Irradiated B16F10 Melanoma Cells. **Plos One**, v. 10, n. 7, p. e0131253, 2015.

RASTOGI, R. et al. NOX Activation by Subunit Interaction and Underlying Mechanisms in Disease. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, v. 10, n. January, p. 1–13, 2017.

REITHINGER, R. et al. Cutaneous leishmaniasis. 2007.

RIBEIRO-ROMÃO, R. P. et al. Comparative Evaluation of Lesion Development , Tissue Damage , and Cytokine Expression in Golden Hamsters (*Mesocricetus auratus*) Infected by Inocula with Different Leishmania (*Viannia*) braziliensis Concentrations. v. 82, n. 12, p. 5203–5213, 2014.

RIBEIRO-ROMÃO, R. P. et al. Development of real-time PCR assays for evaluation of immune response and parasite load in golden hamster (*Mesocricetus auratus*) infected by Leishmania (*Viannia*) braziliensis. **Parasites & Vectors**, p. 1–12, 2016.

RIBEIRO, D. et al. Flavonoids Inhibit COX-1 and COX-2 Enzymes and Cytokine/Chemokine Production in Human Whole Blood. **Inflammation**, v. 38, n. 2, p. 858–870, 2015.

RICHARD, J. V.; WERBOVETZ, K. A. New antileishmanial candidates and lead compounds. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 14, n. 4, p. 447–455, 2010.

RIDOUX, O. et al. In vitro antileishmanial activity of three saponins isolated from ivy, α -hederin, β -hederin and hederacolchiside A1, in association with pentamidine and amphotericin B. **Phytotherapy Research**, v. 15, n. 4, p. 298–301, 2001.

RINCÓN, B. M. et al. Interleukin (IL) -6 Directs the Differentiation of. v. 185, n. 3, 1997.

RITTER, A. M. V. et al. MCP-1 Levels are Associated with Cardiac Remodeling but not with Resistant Hypertension. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 2017.

RODRIGUES, I. A et al. In vitro cytotoxic effects of the essential oil from *Croton cajucara* (red sacaca) and its major constituent 7- hydroxycalamenene against *Leishmania chagasi*. **BMC complementary and alternative medicine**, v. 13, n. 1, p. 249, 2013.

ROGERIO, A. P. et al. Anti-inflammatory effect of quercetin-loaded microemulsion in the airways allergic inflammatory model in mice. **Pharmacological Research**, v. 61, n. 4, p. 288–297, 2010.

ROLLINS, B. Monocyte chemoattractant protein 1: a potential regulator of monocyte recruitment in inflammatory disease. **Molecular medicine today**, v. 2, n. 5, p. 198–204, 1996.

RONDON, F. C. M. et al. In vitro effect of *Aloe vera*, *Coriandrum sativum* and *Ricinus communis* fractions on *Leishmania infantum* and on murine monocytic cells. **Veterinary Parasitology**, v. 178, n. 3–4, p. 235–240, 2011.

RONET, C. et al. Leishmania major-Specific B Cells Are Necessary for Th2 Cell Development and Susceptibility to L. major LV39 in BALB/c Mice. **The Journal of Immunology**, v. 180, n. 7, p. 4825–4835, 2008.

RONET, C. et al. Regulatory B Cells Shape the Development of Th2 Immune Responses in BALB/c Mice Infected with Leishmania major Through IL-10 Production. **The Journal of Immunology**, v. 184, n. 2, p. 886–894, 2010.

ROSENDO A. YUNES. FÁRMACOS E FITOTERÁPICOS: A NECESSIDADE DO DESENVOLVIMENTO DA INDÚSTRIA DE FITOTERÁPICOS E FITOFÁRMACOS NO BRASIL. v. 24, n. 1, p. 147–152, 2001.

ROTTINI, M. M. et al. In vitro evaluation of (–)α-bisabolol as a promising agent against Leishmania amazonensis. **Experimental Parasitology**, v. 148, p. 66–72, 2015.

RUIZ, P. A. et al. Quercetin Inhibits TNF-Induced NF-κB Transcription Factor Recruitment to Proinflammatory Gene Promoters in Murine. n. September 2006, 2007.

RUSSO, M. et al. The flavonoid quercetin in disease prevention and therapy: Facts and fancies. **Biochemical Pharmacology**, v. 83, n. 1, p. 6–15, 2012.

SABOGAL-GUÁQUETA et al. triple transgenic Alzheimer 's disease model mice. p. 134–145, 2016.

SADEGHI-NEJAD, B.; SAKI, J.; AZISH, M. Effect of aqueous Allium cepa and ixora brachiata root extract on Leishmania major promastigotes. **Jundishapur Journal of Natural Pharmaceutical Products**, v. 9, n. 2, p. 24–26, 2014.

SAITO, K. et al. The flavonoid biosynthetic pathway in Arabidopsis: Structural and genetic diversity. **Plant Physiology and Biochemistry**, v. 72, n. February, p. 21–34, 2013.

SAK, K. Site-Specific Anticancer Effects of Dietary Flavonoid Quercetin. **Nutrition and cancer**, v. 66, n. January 2014, p. 37–41, 2013.

SAKIHAMA, Y.; COHEN, M. F.; GRACE, S. C. Plant phenolic antioxidant and prooxidant activities : phenolics-induced oxidative damage mediated by metals in plants. v. 177, p. 67–80, 2002.

SALAY, G. et al. Testing of four Leishmania vaccine candidates in a mouse model of infection with Leishmania (Viannia) braziliensis, the main causative agent of cutaneous leishmaniasis in the new world. **Clinical and Vaccine Immunology**, v. 14, n. 9, p. 1173–1181, 2007.

SALHI, A. et al. Immunological and genetic evidence for a crucial role of IL-10 in cutaneous lesions in humans infected with Leishmania braziliensis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 180, n. 9, p. 6139–6148, 2008.

SANDERSON, L.; YARDLEY, V.; CROFT, S. L. Activity of anti-cancer protein kinase inhibitors against Leishmania spp. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 69, n. 7, p. 1888–1891, 2014.

SANSOM, F. M. et al. Leishmania major Methionine Sulfoxide Reductase A Is Required for Resistance to Oxidative Stress and Efficient Replication in Macrophages. **PLoS ONE**, v. 8, n. 2, p. 15–17, 2013.

SAPAROV, A. et al. Interleukin-2 expression by a subpopulation of primary T cells is linked to enhanced memory/effector function. **Immunity**, v. 11, n. 3, p. 271–280, 1999.

SCHRIEFER, A. et al. Up-Regulation of Th1-Type Responses in Mucosal Leishmaniasis Patients. v. 70, n. 12, p. 6734–6740, 2002.

SCOTT, B. Y. P. et al. IMMUNOREGULATION OF CUTANEOUS LEISHMANIASIS T Cell Lines that Transfer Protective Immunity or Respond to Distinct Parasite Antigens Immunity in leishmaniasis , a chronic protozoal infection of map , is mediated by the stimulation of T cells to produce lym. v. 168, n. November, 1988.

SEKHER PANNALA, A. et al. Flavonoid B-Ring Chemistry and Antioxidant Activity: Fast Reaction Kinetics. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 282, n. 5, p. 1161–1168, 2001.

SEN, G. et al. Quercetin interferes with iron metabolism in Leishmania donovani and targets ribonucleotide reductase to exert leishmanicidal activity. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 61, n. 5, p. 1066–1075, 2008.

SEN, N. et al. Leishmania donovani: Intracellular ATP level regulates apoptosis-like death in luteolin induced dyskinetoplastid cells. **Experimental Parasitology**, v. 114, n. 3, p. 204–214, 2006.

SEN, R. et al. Artemisinin triggers induction of cell-cycle arrest and apoptosis in Leishmania donovani promastigotes. **Journal of Medical Microbiology**, v. 56, n. 9, p. 1213–1218, 2007.

SERRANO-MARTÍN, X. et al. Amiodarone and miltefosine act synergistically against Leishmania mexicana and can induce parasitological cure in a murine model of cutaneous leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 12, p. 5108–5113, 2009.

SHI, J. et al. Epigallocatechin-3-gallate attenuates microcystin-LR induced oxidative stress and inflammation in human umbilical vein endothelial cells. **Chemosphere**, v. 168, p. 25–31, 2017.

SHIO, M. T. et al. PKC/ROS-Mediated NLRP3 Inflammasome Activation Is Attenuated by Leishmania Zinc-Metalloprotease during Infection. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 9, n. 6, p. e0003868, 2015.

SPANOU, C. et al. Flavonoid glycosides isolated from unique legume plant extracts as novel inhibitors of xanthine oxidase. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, 2012.

STUART, K. et al. Kinetoplastids : related protozoan pathogens , different diseases. v. 118, n. 4, p. 1301–1310, 2008.

SUMAN, S. S. et al. Up-regulation of cytosolic trypanothione in Amp B resistant isolates of *Leishmania donovani* and its interaction with cytosolic trypanothione peroxidase. **Biochimie**, v. 121, p. 312–325, 2016.

SUN, E. et al. Regulatory mechanisms of IL-2 and IFN γ suppression by quercetin in T helper cells. v. 76, p. 70–78, 2008.

SUNDAR, S. Drug resistance in Indian visceral leishmaniasis. **Tropical Medicine and International Health**, v. 6, n. 11, p. 849–854, 2001.

SUNDAR, S. et al. Comparison of short-course multidrug treatment with standard therapy for visceral leishmaniasis in India: An open-label, non-inferiority, randomised controlled trial. **The Lancet**, v. 377, n. 9764, p. 477–486, 2011.

SZATKIEWICZ, J. P. et al. An imputed genotype resource for the laboratory mouse. **October**, v. 454, n. 1, p. 42–54, 2008.

SZLISZKA, E. et al. Dietary flavonoids sensitize HeLa cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL). **International Journal of Molecular Sciences**, v. 9, n. 1, p. 56–64, 2008.

TAKAHASHI, A.; YAMAMOTO, N.; MURAKAMI, A. Cardamonin suppresses nitric oxide production via blocking the IFN- γ /STAT pathway in endotoxin-challenged peritoneal macrophages of ICR mice. **Life Sciences**, v. 89, n. 9–10, p. 337–342, 2011.

TEIXEIRA, D. E. et al. The Cell Biology of *Leishmania*: How to Teach Using Animations. v. 9, n. 10, p. 8–11, 2013.

TEXIER, O. et al. Quercetin is recovered in human plasma as conjugated derivatives which retain antioxidant properties. v. 426, p. 331–336, 1998.

TORRES-SANTOS, E. C. et al. Improvement of In Vitro and In Vivo Nanoparticles Improvement of In Vitro and In Vivo Antileishmanial Activities of 2 J , 6 J -Dihydroxy-4 J -Methoxychalcone by Entrapment in Poly (D , L -Lactide) Nanoparticles. v. 43, n. 7, p. 1776–1778, 1999.

TRINCHIERI, G.; S, P.; KASTELEIN, A. The IL- 12 family of heterodimeric cytokines: new players in the regulation of T cell responses. **Immunity**, v. 19, n. 5, p. 641–644, 2003. TRINCONI, C. T. et al. Combination therapy with tamoxifen and amphotericin B in experimental cutaneous leishmaniasis. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 5, p. 2608–2613, 2014.

TRINCONI, C. T. et al. Efficacy of tamoxifen and miltefosine combined therapy for cutaneous leishmaniasis in the murine model of infection with *Leishmania amazonensis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**, v. 71, n. 5, p. 1314–1322, 2016.

TURETZ, M. L. et al. Disseminated Leishmaniasis: A New and Emerging Form of Leishmaniasis Observed in Northeastern Brazil. p. 1829–1834, 2002.

VAIDYA, B. et al. Effectiveness of periodic treatment of quercetin against influenza A virus H1N1 through modulation of protein expression. **Journal of Agricultural and Food Chemistry**, v. 64, n. 21, p. 4416–4425, 2016.

VALE, N. B. DO. A farmacobotânica, ainda tem lugar na moderna anestesiologia? **Revista Brasileira de Anestesiologia**, v. 52, n. 3, p. 368–380, 2002.

VAN ASSCHE, T. et al. Leishmania-macrophage interactions: Insights into the redox biology. **Free Radical Biology and Medicine**, v. 51, n. 2, p. 337–351, 2011.

VANNIER-SANTOS, M. A; MARTINY, A; DE SOUZA, W. Cell biology of Leishmania spp.: invading and evading. **Current pharmaceutical design**, v. 8, n. 4, p. 297–318, 2002.

VENDRELY, V. et al. Resveratrol and capsaicin used together as food complements reduce tumor growth and rescue full efficiency of low dose gemcitabine in a pancreatic cancer model. **Cancer Letters**, v. 390, p. 91–102, 2017.

VERMA, N. K.; DEY, C. S. Possible mechanism of miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*. **Antimicrob. Agents Chemother.**, v. 48, n. 8, p. 3010–3015, 2004.

VERMA, N. K.; SINGH, G.; DEY, C. S. Miltefosine induces apoptosis in arsenite-resistant *Leishmania donovani* promastigotes through mitochondrial dysfunction. **Experimental Parasitology**, v. 116, n. 1, p. 1–13, 2007.

VICKERMAN, K. THE EVOLUTIONARY EXPANSION OF THE TRYPANOSOMATID FLAGELLATES. **International Journal for Parasitology**, v. 24, n. 8, p. 1179–1201, 1994.

VIEIRA, L. L.; SACERDOTI-SIERRA, N.; JAFFE, C. L. Effect of pH and temperature on protein kinase release by *Leishmania donovani*. **Int J Parasitol**, v. 32, n. 9, p. 1085–1093, 2002.

VIGNALI, D. A. A.; KUCHROO, V. K. IL-12 Family Cytokines: Immunological Playmakers. **Computer**, v. 144, n. 5, p. 724–732, 2008.

WABWOBA, B. W. et al. Experimental chemotherapy with *Allium sativum* (Liliaceae) methanolic extract in rodents infected with *Leishmania major* and *Leishmania donovani*. **Journal of Vector Borne Diseases**, v. 47, n. 3, p. 160–167, 2010.

WADHONE, P. et al. Miltefosine promotes IFN-gamma-dominated anti-leishmanial immune response. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 182, n. 11, p. 7146–7154, 2009.

WAN, Q. et al. Effects of quercetin on CDK4 mRNA and protein expression in A549 cells infected by H1N1. **Biomedical reports**, v. 1, n. 5, p. 766–770, 2013.

WANG, H. et al. Quercetin reverses tamoxifen resistance in breast cancer cells. v. 20, n. 89, p. 707–713, 2015a.

WANG, Y. et al. The critical role of quercetin in autophagy and apoptosis in HeLa cells. **Tumor Biology**, 2015b.

WANG, Z. et al. Competitive binding experiments can reduce the false positive results of affinity-based ultrafiltration-HPLC: A case study for identification of potent xanthine oxidase inhibitors from *Perilla frutescens* extract. **Journal of Chromatography B**, v. 1048, p. 30–37, 2017.

WENG, Z. et al. Quercetin is more effective than cromolyn in blocking human mast cell cytokine release and inhibits contact dermatitis and photosensitivity in humans. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. 1–10, 2012.

WENIGER, B. et al. Antiprotozoal activities of Colombian plants. **J Ethnopharmacol**, v. 78, p. 193–200, 2001.

WHEAT, W. H. et al. *Lutzomyia longipalpis* salivary peptide maxadilan alters murine dendritic cell expression of CD80/86, CCR7, and cytokine secretion and reprograms dendritic cell-mediated cytokine release from cultures containing allogeneic T cells. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 180, n. 12, p. 8286–98, 2008.

XENÓN SERRANO-MARTÍN et al. Amiodarone destabilizes intracellular Ca²⁺ homeostasis and biosynthesis of sterols in *Leishmania mexicana*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 53, n. 4, p. 1403–1410, 2009.

XIAO, X. et al. Quercetin suppresses cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis through inactivation of P300 signaling. **PLoS ONE**, v. 6, n. 8, 2011.

XU, M. Gold-quercetin nanoparticles prevent metabolic endotoxemia-induced kidney injury by regulating TLR4 NF- κ B signaling and Nrf2 pathway in high fat diet fed mice_2017.pdf. p. 327–345, 2017.

XUE, F. et al. Quercetin inhibits LPS-induced inflammation and ox-LDL-induced lipid deposition. **Frontiers in Pharmacology**, v. 8, n. FEB, p. 1–8, 2017.

YAMAMOTO, E. S. et al. Treatment with triterpenic fraction purified from *Baccharis uncinella* leaves inhibits *Leishmania (Leishmania) amazonensis* spreading and improves Th1 immune response in infected mice. **Parasitology Research**, v. 113, n. 1, p. 333–339, 2014.

YEN, G.-C. et al. Pro-oxidative properties of flavonoids in human lymphocytes. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 67, n. 6, p. 1215–1222, 2003.

ZHANG, M. et al. Quercetin ameliorates LPS-induced inflammation in human peripheral blood mononuclear cells by inhibition of the TLR2-NF- κ B pathway. v. 15, n. II, p. 1–9, 2016a.

ZHANG, O. et al. Developmentally regulated sphingolipid degradation in *Leishmania major*. **PLoS ONE**, v. 7, n. 1, p. 1–10, 2012.

ZHANG, Y. et al. Quercetin Isolated from *Toona sinensis* Leaves Attenuates Hyperglycemia and Protects Hepatocytes in High-Carbohydrate/High-Fat Diet and Alloxan Induced Experimental Diabetic *Mice*. **Journal of Diabetes Research**, v. 2016, p. 1–10, 2016b.

ZHANG, Y. et al. Quercetin Isolated from *Toona sinensis* Leaves Attenuates Hyperglycemia and Protects Hepatocytes in High-Carbohydrate/High-Fat Diet and Alloxan Induced Experimental Diabetic *Mice*. **Journal of Diabetes Research**, v. 2016, p. 1–10, 2016c.

ZHOU, Y.-Y. et al. MAPK/JNK signaling: A potential autophagy regulation pathway. **Bioscience Reports**, p. 1–10, 2015.