



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM NEUROCIÊNCIAS E BIOLOGIA
CELULAR

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO EXTRATO DA RAIZ DE *Physalis*
angulata E SUA AÇÃO NA CÉLULA HOSPEDEIRA.**

RAQUEL RAICK PEREIRA DA SILVA
Biomédica

BELÉM – PARÁ – BRASIL

2013

RAQUEL RAICK PEREIRA DA SILVA

**ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO EXTRATO DA RAIZ DE *Physalis*
angulata E SUA AÇÃO NA CÉLULA HOSPEDEIRA.**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Neurociências e Biologia Celular, Curso de Mestrado, no Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará.

Prof^ª. Dra. Edilene Oliveira da Silva-Orientadora

BELÉM - PA

2013

ATIVIDADE LEISHMANICIDA DO EXTRATO DA RAIZ DE *Physalis angulata* E SUA AÇÃO NA CÉLULA HOSPEDEIRA.

Por

RAQUEL RAICK PEREIRA DA SILVA

Orientadora: **Prof^a. Dra. Edilene Oliveira da Silva**

Instituto de Ciências Biológicas, UFPA

Dissertação de mestrado apresentada no Programa de Pós-Graduação em neurociência e Biologia, curso de Mestrado, no Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Pará, sob avaliação da seguinte banca:

Membro: **Profa. Dr. Sanny Helena Valente De Oliveira Alberio,**
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, UEPA.

Membro: **Dra. Marta Chagas Monteiro,**
Faculdade de Farmácia, UFPA.

Suplente: **Prof. Dr. José Luiz Martins do Nascimento,**
Instituto de Ciências Biológicas, UFPA.

BELÉM – PARÁ, 23 de Maio de 2013.

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Parasitologia e de Biologia Estrutural (LBE) do Instituto de Ciências Biológicas, em colaboração com o Laboratório de Cromatografia líquida do Instituto de Ciências Exatas e Naturais, ambos na Universidade Federal do Pará, com suporte financeiro das seguintes agências: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) para financiamento da bolsa de mestrado e do Projeto de Cooperação Interinstitucional em Neurociências e Biologia Celular em Modelos Experimentais de Interesse na Região Amazônica e Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagem – Instituto do Milênio (INCTBEB de Biologia), sendo gerada a submissão de um manuscrito na Evidence-Based complementary and Alternative medicine (Submissão em 17/05/2013).

*“O temor do senhor é a instrução da sabedoria, e diante da honra vai a
humildade”.*

Provérbios 15:33

*Ao meu Deus pelas bênçãos sem medida, misericórdia
E vitórias concedidas ao longo dessa caminhada...
Aos meus pais, pelo apoio e amor incondicional...*

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus pelas vitórias concedidas ao longo desses anos, sabedoria, bom ânimo e força que me fizeram alcançar e realizar meus ideais, sem Deus eu não sou nada e para ele o meu maior agradecimento. Obrigada Senhor, de gratos louvores transbordam o meu coração.

À minha mãe, Selma, exemplo de força e perseverança, por me ensinar a valorizar os meus estudos desde criança, pelos seus ensinamentos e educação, que sempre ficarão gravados no meu coração. Ao meu pai, Alfredo, por acreditar na minha capacidade, e nunca medir esforços para proporcionar minha educação. Sem o apoio de vocês essa conquista não seria possível.

À minha orientadora Prof^a. Edilene, por todos esses anos de orientação, obrigada pela oportunidade, confiança, incentivo a buscar conhecimento e paciência concedida desde a iniciação científica.

Ao Dr. Fernando Tobias Silveira, do Instituto Evandro Chagas pelo fornecimento das cepas de *Leishmania* utilizadas no trabalho.

Ao Dr. Hilton Tulio Tosti, do Museu Emílio Goeldi, ao Dr. Cláudio Nery Lamarão, da UFPA, pela ajuda no processamento das amostras para análise em Microscopia eletrônica de Varredura (MEV) e ao Dr. José Antonio Picanço Diniz Junior, pela obtenção das imagens de MEV.

Ao Prof José Luiz, pela contribuição que concedeu ao artigo e utilização de equipamentos do Laboratório de Neuroquímica.

À Rachel Rachid, pela grande ajuda que concedeu no mês que passei na Universidade do Rio de Janeiro, auxiliando nos experimentos, imagens de MEV e pela maravilhosa companhia.

Ao Rodrigo Albuquerque, grande amigo, acompanhou a minha trajetória e de perto todos os medos e dificuldades. Obrigada pelas palavras positivas e orações.

À Ana Paula e Luis Henrique, pessoas que me ensinaram muita coisa. Obrigada por todos os ensinamentos, dicas, por todas as discussões de protocolos, análises no citômetro, pela atenção dedicada nos momentos de dúvida, e principalmente pelas altas risadas dadas nos nossos cafés e infinitas caronas rsrs.

À Amanda Hage, Amadinha, gatinha e diabética, minha companheira de mestrado, ou seja, de desespero. Acompanhou minha iniciação científica desde o início, e depois acabamos nos encontrando novamente no mestrado. Com ela dividi vários momentos

importantes, e um longo mês no Rio de Janeiro, onde aprendemos o significado de parceria e principalmente respeitar as diferenças. Obrigada pela amizade, força e palavras que foram importantes em muitos momentos.

Ao Rodrigo Furtado, que está comigo desde a de iniciação, é meu guia no Rio de Janeiro rsrs. Obrigada pelos vários momentos de descontração, caronas e pelas Leishmanias, é claro.

Ao Bruno Martins, pessoa maravilhosa que conheci e tive a oportunidade de passar um pouco do que aprendi, veio para dividir comigo o “fardo” de trabalhar com extrato de planta e acabar com o império do AK rsrs. Obrigada por toda ajuda concedida no desenvolvimento deste trabalho, até mesmo quando não pedia você estava lá, nunca irei esquecer.

À Paula Frade, pessoa maravilhosa que tive o prazer de conviver, ensinar e compartilhar muitos momentos. Obrigada por muitas vezes está ali para, simplesmente, escutar, pelo ombro amigo, e pelas infinitas vezes que fizestes eu rir só de escutar sua risada.

À Josineide Pantoja, mulher de Deus, pesquisadora nata e uma grande amiga. Tive o prazer de ensinar e juntas vivemos o drama da qualificação. Agradeço a Deus por ter colocado você na minha vida. Obrigada pela torcida, força e por ter segurado minha mão rs.

À Carol Martins, amoreca e Camila Abdon, papaizinha, muito obrigada pela amizade cultivada. Obrigada pelas palavras de apoio e carinho. Vocês moram no meu coração.

À Fernandinha do LBE por sempre ser atenciosa comigo e pela ajuda que forneceu com as minhas amostras de microscopia eletrônica de transmissão.

Ao Jorge e Lienne, meus novos colegas, obrigada pelos vários momentos de alegria e descontração, lanches da tarde, passeios no shopping essenciais para aliviar a mente e ficar pobre rsrs.

Aos colegas Davi e Aprígio pelos vários momentos de descontração, e aos novos membros do laboratório: Evelen, Ingrid e Sandro, muito obrigada pela torcida.

E a todos que de alguma forma contribuíram com para realização deste trabalho.

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS E TABELA.....	11
LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS.....	13
RESUMO.....	15
ABSTRACT.....	16
1. INTRODUÇÃO.....	1
1.1. O GÊNERO <i>LEISHMANIA</i>	2
1.1.1. Classificação	2
1.1.2. Morfologia	3
1.1.3. Ciclo biológico.....	4
1.2.1 Membrana Plasmática	6
1.2.3 Flagelo	8
1.2.4 Mitocôndria e Cinetoplasto	9
1.2.5 Núcleo.....	9
1.2.6 Outras organelas.....	10
1.3 A LEISHMANIOSE	11
1.3.1 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)	11
1.3.2 Aspectos epidemiológicos, clínicos e imunológicos.....	11
1.5 INTERAÇÃO PARASITO – HOSPEDEIRO.....	14
1.6 TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES	16
1.8 <i>PHYSALIS ANGULATA</i>	19
2. JUSTIFICATIVA.....	22
3. OBJETIVOS.....	23
3.1. OBJETIVO GERAL	23
3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	23
4. MATERIAL E MÉTODOS.....	24
4.1 OBTENÇÃO E DILUIÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DA RAÍZ DA PLANTA <i>P.ANGULATA</i>	24
4.2 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DO EXTRATO AQUOSO.....	24
4.3 CULTIVO E MANUTENÇÃO DO PARASITO	24
4.4 OBTENÇÃO E CULTIVO DA CÉLULA HOSPEDEIRA	24
4.5 ATIVIDADE LEISHMANICIDA	25
4.5.1 Atividade antipromastigota	25
4.5.2 Atividade anti-amastigota.....	25
4.6 ANÁLISE DA EXTERNALIZAÇÃO DE FOSFATIDILSERINA E VOLUME CELULAR DE PROMASTIGOTAS TRATADAS.....	26
4.7 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL DE PROMASTIGOTAS TRATADAS COM O EXTRATO.....	27
4.7.1 Microscopia Óptica	27
4.7.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)	27
4.7.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	27
4.8 DETECÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DA CÉLULA HOSPEDEIRA TRATADA COM O EXTRATO	28
4.8.1 Método Thiazolyl Blue (MTT)	28
4.8.2 Detecção de Potencial da Membrana Mitocondrial (JC-1)	29
4.8.3 Iodeto de Propídio (IP).....	29

4.9 ANÁLISE MORFOLÓGICA DA CÉLULA HOSPEDEIRA TRATADA COM O EXTRATO	30
4.9.1 Microscopia óptica.....	30
4.9.2 Microscopia Óptica de Fluorescência - detecção de filamentos de actina e microtúbulos.....	30
4.9.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	31
4.9.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)	31
4.10 PRODUÇÃO DE RADICAIS SUPERÓXIDOS EM MACRÓFAGOS INFECTADOS E TRATADOS COM O EXTRATO	31
4.10.1 Detecção de radicais superóxidos em macrófagos tratados com o extrato.....	31
4.10.2 Detecção de radicais superóxidos em macrófagos infectados e tratados com o extrato.....	32
4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA	32
5. RESULTADOS.....	33
5.1 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DO EXTRATO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA	33
5.2 ATIVIDADE LEISHMANICIDA	34
5.2.1 Atividade antipromastigota	34
5.2.2 Atividade antiamastigota.....	35
5.3 EXTERNALIZAÇÃO DE FOSFATIDILSERINA E REDUÇÃO DO VOLUME CELULAR EM PROMASTIGOTAS APÓS TRATAMENTO COM O EXTRATO.....	36
5.4 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DE PROMASTIGOTAS TRATADAS COM O EXTRATO	37
5.4.1 Microscopia óptica.....	37
5.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	40
5.4.3 Microscopia Eletrônica de transmissão (MET).....	43
5.5 DETECÇÃO DA VIABILIDADE DA CÉLULA HOSPEDEIRA TRATADA COM O EXTRATO	46
5.5.1 Método colorimétrico <i>Thiazolyl Blue</i> (MTT).....	46
5.5.2 Detecção do Potencial de Membrana Mitocondrial (JC-1)	46
5.5.3 Iodeto de Propídio (IP)	48
5.6 ANÁLISE MORFOLÓGIA DA CÉLULA HOSPEDEIRA.....	49
5.6.1 Microscopia Óptica.....	49
5.6.2 MICROSCOPIA ÓPTICA DE FLUORESCÊNCIA.....	52
5.6.3 MICROSCOPIA ELETRÔNICA DE VARREDURA (MEV)	55
5.8 PRODUÇÃO DE RADICAIS SUPERÓXIDOS POR MACRÓFAGOS INFECTADOS E TRATADOS COM O EXTRATO.....	61
5.8.1 Produção de superóxidos por macrófagos tratados com o extrato.	61
5.8.2 Produção de superóxidos em macrófagos infectados e tratados com o extrato.....	63
6. DISCUSSÃO.....	66
7. CONCLUSÕES	72
8. PRODUÇÃO CIENTÍFICA.....	73
9. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS.....	73
10. MESTRADO SANDUÍCHE.....	73
11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	74
ANEXOS.....	85

LISTA DE FIGURAS E TABELA

Figura 1: Taxonomia do gênero <i>Leishmania</i>	3
Figura 2: Formas evolutivas do parasita <i>Leishmania</i> sp..	4
Figura 3: Ciclo de vida do parasita do gênero <i>Leishmania</i> sp.....	6
Figura 4: Estrutura do flagelo de <i>Leishmania</i> sp em promastigotas e amastigotas.....	9
Figura 5: Casos notificados de leishmaniose tegumentar americana, Brasil – 1980 a 2010....	12
Figura 6. Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar.	13
Figura 7. Mecanismo esquemático da ação da enzima iNOS.....	14
Figura 8: Reconhecimento das formas promastigotas por macrófagos.....	15
Figura 9: (A) Planta <i>Physalis angulata</i> e (B) Fruto da planta.	19
Figura 10: Esqueleto básico das Fisalinas	20
Figura 11. Curva de crescimento de promastigotas de <i>Leishmania (L) amazonensis</i> tratadas com diferentes concentrações de Glucantime (A) e de Pa (B) durante 96h.	34
Figura 12. Efeito do extrato de Pa sobre amastigotas <i>L. (L.) amazonensis</i> . Macrófagos infectados foram tratados com diferentes concentrações do extrato, por 1 hora, durante três dias consecutivos.	35
Figura 13. Exposição de fosfatidilserina em formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com o extrato de <i>P. angulata</i> por 72 h utilizando anexina-V e IP.	36
Figura 14: Volume celular de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> tratadas com 100µg/mL do extrato de Pa por 72 h.	37
Figura 15. Alterações morfológicas das formas promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> tratadas com o extrato aquoso de Pa por 72h e corados com Giemsa.	38
Figura 16. Alterações morfológicas em promastigotas de <i>L. (L.) amazonensis</i> tratadas com extrato aquoso de <i>P. angulata</i> e observadas através de MEV.....	41
Figura 17. Alterações ultraestruturais de promastigotas de <i>Leishmania (L.) amazonensis</i> tratadas com o extrato aquoso de Pa.....	44
Figura 18. Viabilidade celular pelo método MTT em macrófagos tratados com o extrato de Pa durante 1 hora e mantidos em cultivo por 24 horas.....	46
Figura 19. Análise por citometria de fluxo da viabilidade celular pelo método JC-1 em macrófagos tratados com o extrato de Pa durante 1 hora.	47

Figura 20. Análise por Microscopia de fluorescência da viabilidade celular pelo método JC-1 em macrófagos tratados com o extrato de Pa por 1 hora.....	47
Figura 21. Ensaio de apoptose por citometria de fluxo utilizando Iodeto de Propídio como marcador em macrófagos tratados com extrato de Pa.	48
Figura 22. Análise morfológica de macrófagos tratados com extrato de Pa por 1 hora e corados com Giemsa.....	50
Figura 23. Detecção de componentes do citoesqueleto em macrófagos tratados com 100 µg/mL do extrato de Pa.	53
Figura 24. Microscopia eletrônica de Varredura de Macrófagos tratados com 50 e 100 µg/mL Pa.	56
Figura 25. Análise ultraestrutural de macrófagos tratados com o extrato de Pa por 1h.....	59
Figura 26. Detecção da produção de radicais superóxido através da reação com NBT em macrófagos tratados com o extrato aquoso de Pa por 1 hora.....	62
Figura 27. Detecção da produção espécies reativas de oxigênio através da reação com NBT em macrófagos infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com o extrato aquoso de Pa por 1 hora.	64
Tabela 1. Análise dos componentes do extrato de Pa por espectrometria de massa de alta resolução por micrTOF II -ESITOF.....	33

LISTA DE SÍMBOLOS E ABREVIATURAS

BSA – Bovina serum albumin

DAPI – Diamino fenilindole

DMSO – Dimetilsufóxido

DMEM – Dulbecco's Modified Eagle's Medium

GP63 – Glicoproteína 63

H₂O₂ – Peróxido de hidrogênio

IC₅₀ – concentração inibitória máxima capaz de inibir em 50% o crescimento de uma célula

INF- γ – Interferon γ

iNOS – Óxido nítrico sintase induzida

LC – Leishmaniose cutânea

LPG – Lipofosfoglicano

LTA – Leishmaniose tegumentar americana

LVA – Leishmaniose visceral americana

MET – Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV – Microscopia Eletrônica de Varredura

MTT – Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide

$\Delta\Psi$ – Potencial da membrana mitocondrial

NADPH – nicotinamida adenina dinucleotídeo
fosfatase hidrogenase

NBT – Nitroblue tetrazolium

NF-kB – Fator de transcrição nuclear

NH_4Cl – Cloreto de amônio

NO – Óxido nítrico

O_2^- – Íon superóxido

OH^\cdot – Radical hidroxila

PBS – Sigla inglesa para tampão fosfato salino

PS – Fosfatidilserina

ROS – Radicais de oxigênio

RPMI – Roswell Park Memorial Institute

SBF – Soro Bovino Fetal

SOD – Superóxido dismutase

TGF- β – Sigla inglesa para fator modulador de crescimento

TNF- α – Sigla inglesa para fator de necrose tumoral

RESUMO

A Leishmaniose é uma doença infecciosa causada por várias espécies de parasitas do gênero *Leishmania*. A quimioterapia é o único tratamento efetivo para a doença, mas essas drogas são, em geral, tóxicas e requer um longo período de tratamento. Produtos naturais provenientes de plantas oferecem novas perspectivas e representam uma importante fonte de novos agentes leishmanicidas. Assim, é de grande importância avaliar os efeitos do extrato aquoso da raiz de *Physalis angulata*, planta amplamente utilizada pela medicina popular, em formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e sua ação sobre a célula hospedeira. As fracionas D, E, F e G foram demonstradas pela primeira vez na raiz de *P. angulata* pela análise cromatográfica. Uma atividade antiproliferativa e uma inibição dose dependente de promastigotas 74,1% e 99,8 % (IC₅₀ 35,5 µg/mL) e amastigotas 70,6% e 70,9% (IC₅₀ 32,0 µg/mL) foram observadas quando os parasitas foram tratados com 50 e 100 µg/mL do extrato, respectivamente. A análise da atividade microbicida da célula hospedeira infectada com *L. amazonensis* mostrou que extrato foi capaz de reverter o efeito causado pelo parasito de inibir a produção de espécies reativas de oxigênio. O tratamento com o extrato também induziu alterações morfológicas importantes em formas promastigotas avaliadas por microscopia óptica, microscopia eletrônica de transmissão e varredura. Foram observadas alterações na morfologia, na divisão celular, principalmente na fase de citocinese, na membrana flagelar, na bolsa flagelar e alterações em organelas importantes, como o cinetoplasto, onde ocorreu duplicação irregular e alteração do seu tamanho. Já por citometria de fluxo foi possível confirmar que o tratamento induziu uma exposição de fosfatidilserina e diminuição no volume celular de promastigotas tratadas. Com relação à célula hospedeira, o extrato promoveu alterações no citoesqueleto, o aumento número de projeções citoplasmáticas, do volume celular e de vacúolos e da habilidade de espraiamento sem causar efeito citotóxico ou alteração ultraestrutural em macrófagos tratados com o extrato. Assim, estes resultados demonstram que o extrato aquoso da raiz de *P. angulata* foi eficaz na ativação da célula hospedeira e na inibição do crescimento do protozoário, o que representa uma fonte alternativa e promissora de agente leishmanicida.

Palavras-chave: Atividade Leishmanicida; Alterações ultraestruturais; *L. (L.) amazonensis*, *Physalis angulata*.

ABSTRACT

Leishmaniasis is an infectious disease caused by various species of the protozoan parasites of the *Leishmania* genus. The chemotherapy is the only effective treatment for the disease, but these drugs are, in general, toxic and requires a longer treatment period. Natural products have been used as traditional medicine and offer new perspectives and represent an important source of new antileishmanial agents. Thus, it is of great importance to assess the effects of the aqueous extract of the root of *Physalis angulata*, a plant widely used in popular medicine, in promastigotes and amastigotes of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and its effect on the host cell. Physalins D, E, F and G were found present, for the first time, in the *P. angulata* roots using liquid chromatography/mass spectrometry analysis. Antiproliferative activity and a dose-dependent inhibition of promastigote growth 74.1% and 99.8 % (IC₅₀ 35.5 µg/mL), and intracellular amastigotes 70.6% and 70.8% (IC₅₀ 32.2 µg/mL) was observed when parasites were treated with 50 and 100 µg/ mL of extract, respectively. The analysis of the microbicidal activity of host cell infected, with *L. amazonensis* demonstrated that extract is able to reverse the effect caused by the parasite to inhibit the production of reactive oxygen species. This growth inhibition was associated with several morphological alterations assessed by optical microscopy, transmission electron microscopy and scanning such as alteration on cell division, especially in the phase of cytokinesis, alteration in flagellar membrane, in flagellar pocket and duplication of kinetoplast DNA. Already by flow cytometry was possible to confirm that the treatment induced a phosphatidylserine exposure and decreased cell volume of promastigotes treated. In the host cell were observed cytoskeleton alterations, high number of cytoplasmatic projections, increase of cytoplasm, vacuoles and spreading ability. No cytotoxicity towards macrophages was observed. We have demonstrated that aqueous extract effectively promotes antileishmanial activity and clearly demonstrate the induction of apoptosis and ultrastructural alterations in *Leishmania* parasites. Thus, aqueous extract may represent a promising natural alternative source for a new antileishmanial agent.

Keywords: leishmanicidal activity; ultrastructural alterations; *Leishmania amazonensis amazonensis*; macrophage viability; *Physalis angulata*;

1. INTRODUÇÃO

As Leishmanioses são antropozoonoses (NEUBER, 2008; BRASIL, 2010) consideradas como um grande problema de saúde pública, e afetam mais de 12 milhões de pessoas no mundo e tem como agente etiológico parasitas pertencentes ao gênero *Leishmania*. A transmissão ocorre durante o repasto sanguíneo de vetores fêmeas, conhecidos como flebotomíneos (ANDRADE *et al.*, 2007; WHO, 2010).

A leishmaniose é considerada endêmica em 98 países e a maioria dos casos ocorre principalmente em países tropicais e subtropicais em desenvolvimento (ALVAR *et al.*, 2012; OKWOR & UZONNA, 2009). Brasil e Peru são os países da América Latina que registram o maior número de casos, cerca de 90% do total notificado (WHO, 2010).

A infecção por *Leishmania* pode ser classificada em três formas clínicas principais: cutânea, mucocutânea e visceral. As manifestações clínicas da doença dependem de vários fatores tais como, as espécies envolvidas e tipo de resposta imune do hospedeiro que estarão associados a uma série de sinais, sintomas e grau de severidade, e a principal medida intervencional para essa doença é a quimioterapia (DAVID & CRAFT, 2009).

Nos últimos sessenta anos, os antimoniais pentavalentes são utilizados como drogas de primeira escolha para o tratamento da leishmaniose. No entanto, efeitos colaterais adversos, diferentes graus de resistência ao parasita, custo elevado e tempo de tratamento são fatores limitantes para seu uso. Em casos de não haver resposta ou impossibilidade de tratamento com essas drogas, a segunda escolha de tratamento são a anfotericina B e pentamidina, porém ainda assim são tóxicas e apresentam efeitos colaterais. (CROFT *et al.*, 2001; CHAKRAVARTY & SUNDAR, 2010).

Terapias recentemente desenvolvidas, como a miltefosina, o primeiro medicamento de uso oral (COSTA FILHO *et al.*, 2008), paramomicina e anfotericina B lipossomal (CROFT *et al.*, 2006), são empregados mais recentemente contra a leishmaniose visceral (LV) e testados contra leishmaniose tegumentar (LT) (ASILIAN *et al.*, 2003; WORTMANN *et al.*, 2010). Além disso, vários estudos estão sendo desenvolvidos para verificar atividade leishmanicida de bioprodutos principalmente pela facilidade de obtenção e baixos custos (ROCHA *et al.*, 2005; SEN & CHATTERJEE, 2011).

Na ausência de vacina e um tratamento eficaz, há uma necessidade urgente de desenvolvimento de novos medicamentos, potencialmente menos tóxicos e de baixo custo. O estudo de substâncias extraídas de plantas apresenta-se como alternativa atraente nessa busca, especialmente na região Amazônica devido à grande biodiversidade.

1.1. O GÊNERO *Leishmania*

1.1.1. Classificação

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

Até o início da década de 1960, a classificação deste gênero baseava-se inicialmente em características extrínsecas, como: distribuição geográfica, manifestações clínicas, vetores, reservatórios e padrões epidemiológicos (BAÑULS *et al.*, 2007; VALE & FURTADO, 2005). No entanto, a classificação ganhou novo impulso ao analisar critérios intrínsecos tais como, imunológicos, bioquímicos e moleculares. Estes revelaram que avaliar somente manifestações clínicas e aspectos geográficos era inadequado, desta forma atualmente estes critérios são utilizados para definir espécies de *Leishmania*.

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

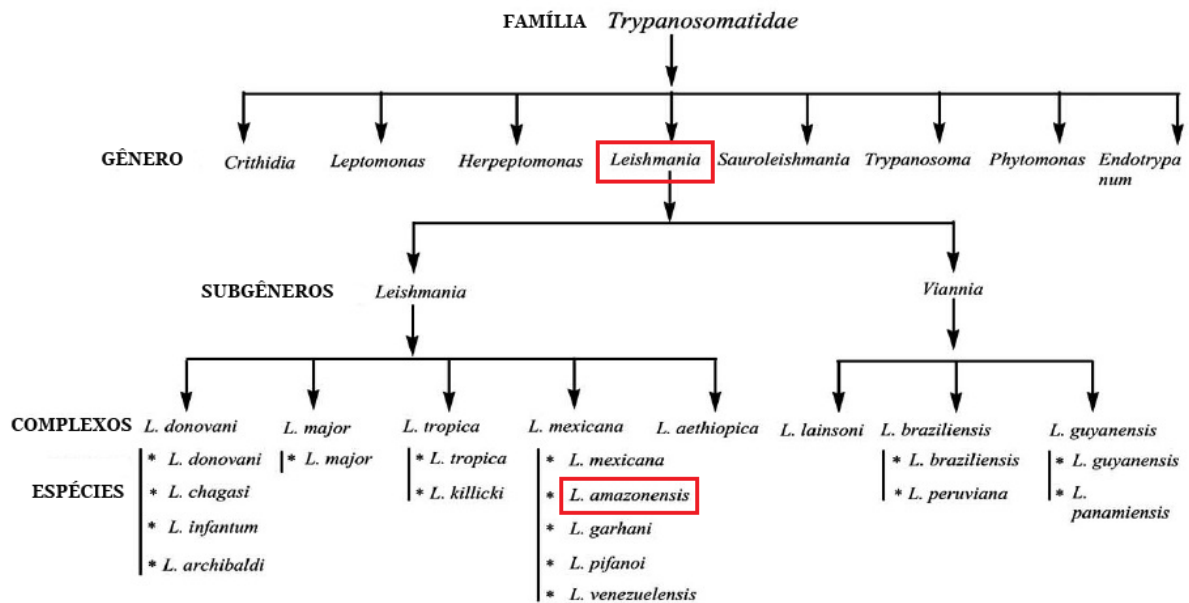


Figura 1: Taxonomia do gênero *Leishmania*.

Fonte: MISHRA *et al.*, 2009 (modificada).

1.1.2. Morfologia

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

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

Já as formas amastigotas são parasitas intracelulares de células do sistema fagocítico mononuclear (SFM). Apresenta corpo celular pequeno de contorno ovóide. As amastigotas possuem flagelo curto e internalizado na bolsa flagelar, uma invaginação do corpo do parasita, e são pouco móveis (Figura 2B). Na bolsa flagelar não são encontrados

microtúbulos subpeliculares e há grande atividade de excreção e de pinocitose. O cinetoplasto presente em ambas as formas, é uma região que apresenta o DNA mitocondrial altamente condensado em uma região perpendicular a base do flagelo, característico de sua ordem Kinetoplastida (DE SOUZA, 2008). No citoplasma ainda são observados o complexo de Golgi e o retículo endoplasmático, além de vacúolos e inclusões.

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

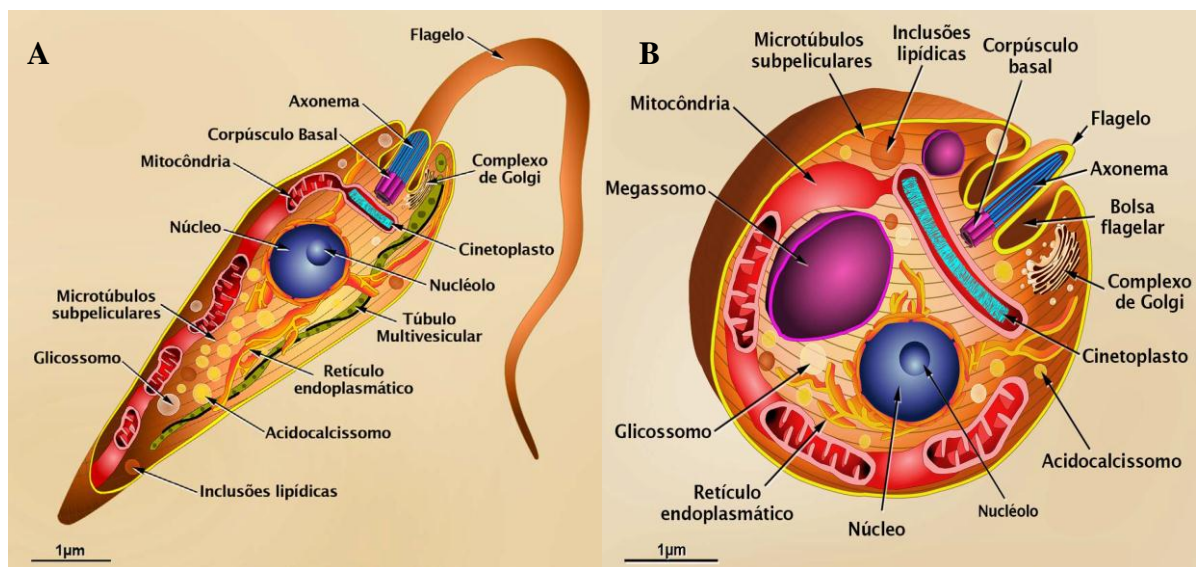


Figura 2: Formas evolutivas do parasita *Leishmania sp.* Promastigota (A) e amastigota (B). Desenho esquemático das principais organelas intracelulares das formas evolutivas de *Leishmania*. A bolsa flagelar está localizada na porção anterior da célula.

Fonte: Paulo Henrique Crepaldi (TEIXEIRA *et al.*, 2013).

1.1.3. Ciclo biológico

Os ciclos de transmissão da leishmaniose variam de acordo com a região geográfica, espécie de parasito, vetores, reservatórios e hospedeiros. É importante ressaltar, que *Leishmania (Leishmania) amazonensis* é uma espécie com mais ampla distribuição, tendo sido notificada em todas as regiões brasileiras. O ciclo de transmissão ocorre em áreas florestais da Amazônia Legal (Amazonas, Pará, Tocantins e Maranhão), e também em alguns Estados do Nordeste (Bahia), do Sudeste (Minas Gerais e São Paulo), Centro-Oeste (Goiás) e Sul (Paraná) (BRASIL, 2010).

Primeiramente, os hospedeiros vertebrados são infectados por formas promastigotas metacíclicas, transmitidas por fêmeas dos insetos vetores, durante o repasto sanguíneo. O vetor possui um aparelho bucal curto e rígido, adaptado para dilacerar o tecido e vasos sanguíneos do hospedeiro, isso é de suma importância para inoculação e ingestão das formas infectantes (MAURER *et al.*, 2009; KAYE & SCOTT, 2011).

É na pele que as formas promastigotas serão reconhecidas e fagocitadas por células do SFM sendo internalizadas em vacúolos parasitóforos. Após a internalização ocorre a fusão do vacúolo parasitóforo com lisossomos, formando o fagolisossomo onde por ação de enzimas, alterações do pH e temperatura, as formas promastigotas transformam-se em forma amastigota (ALCOLEA *et al.*, 2010; GLUENZ *et al.*, 2010). Esta forma de resistência mantém o controle das condições ambientais internas do vacúolo e passa a se replicar no interior de macrófagos até sua ruptura, passando a infectar outras células (macrófagos, células dendríticas, neutrófilos e mastócitos), atraídos para o lugar da inoculação, onde ocorre uma reação inflamatória e posterior recrutamento de células T e formação de granuloma (MAURER *et al.*, 2009; KAYE & SCOTT, 2011).

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

O ciclo de vida se completa quando há infecção de um novo flebotomíneo ao se alimentar de hospedeiros infectados (Figura 3).

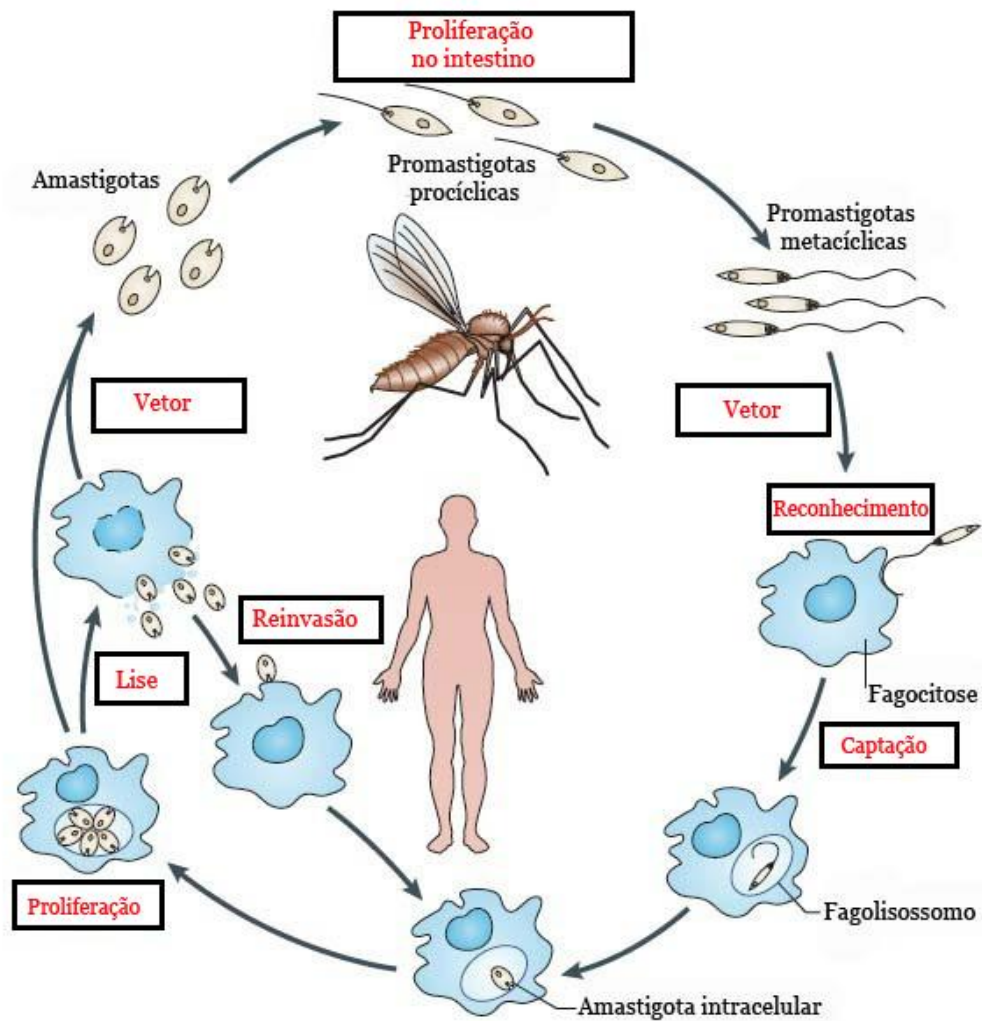


Figura 3: Ciclo de vida do parasita do gênero *Leishmania* sp.
 Fonte: KAYE & SCOTT, 2011 (Modificada).

1.2 *Leishmania*: ORGANIZAÇÃO ESTRUTURAL

Protozoários unicelulares, digenéticos e flagelados apresentam estruturas e organelas específicas de sua ordem Kinetoplastida, e outras estruturas comuns a outros eucariotos.

1.2.1 Membrana Plasmática

O corpo do protozoário é de grande importância, pois ela interage diretamente com o seu hospedeiro. A membrana plasmática dos protozoários apresentam estrutura e

funções semelhantes a outros organismos, funcionando como uma barreira seletiva entre o citoplasma e o meio externo e também são constituída de proteínas, lipídeos e carboidratos.

Estes parasitas possuem uma superfície de membrana de diferentes composições e funções e por isso é dividido em três subdomínios morfologicamente diferente: a membrana flagelar, a bolsa flagelar e a membrana plasmática do corpo celular. Cada domínio apresenta uma membrana altamente especializada com funções diferenciadas, e apresentam uma diversificada distribuição de lipídios e proteínas de superfície. A membrana plasmática que rodeia o corpo da célula está associada aos microtúbulos subpeliculares e contém diversas proteínas de superfície como LPG e GP63, que protegem o parasita contra a resposta imune do hospedeiro. No domínio flagelar, a membrana tem o papel de envolver os microtúbulos do axonema, enquanto que a membrana que envolve a bolsa flagelar não está associado a nenhuma estrutura do citoesqueleto, e por esse motivo a bolsa flagelar é responsável pela absorção de nutrientes e secreção de proteínas para o meio extracelular, ou seja, é o local exclusivo para a endocitose e exocitose no parasito (LANDFEAR & IGNATUSHCHENKO, 2001; FIELD & CARRINGTON, 2009).

1.2.2 Citoesqueleto

A rigidez ou a flexibilidade do corpo e a sua forma são enormemente dependentes da natureza do citoesqueleto. Este se localiza geralmente sob a membrana plasmática.

Existem três classes de microtúbulos nos parasitas tripanossomatídeos: flagelar, corpo basal e subpeliculares, que estão envolvidas na locomoção, divisão celular e manutenção da forma da célula, respectivamente. Nestes organismos, os genes da tubulina são descritos como famílias multigênicas cuja organização varia amplamente entre as espécies. (KOHL & GULL, 1998; JAYANARAYAN & DEY, 2002).

Em relação aos microtúbulos subpeliculares foi demonstrado que eles estão ligados entre si e estão situados logo abaixo da membrana plasmática e a outras organelas com a participação de filamentos finos, cuja composição ainda não foi estabelecida. São importantes para manter a forma das células e, além disso, conferem rigidez ao corpo celular, pois estão interligados protegendo parasito de estresses mecânicos. O corpo do parasita é totalmente revestido pelos microtúbulos subpeliculares, exceto na região da bolsa flagelar (GULL, 1999; DE SOUZA, 2008).

Os microtúbulos originam-se nos corpos basais, uma organela formada a partir de centríolos e em caso dos protozoários flagelados funciona como a base de onde flagelo e

axonema são construídos (FIELD & CARRINGTON, 2009).

Além dos microtúbulos, o citoesqueleto de *Leishmania* também possuem actina, uma proteína que auxilia em processos de motilidade, contratilidade e transporte celular em todos os eucariotos. Neste parasito a actina está presente no flagelo, bolsa flagelar, próximo ao núcleo, cinetoplasto, membrana plasmática e associada aos microtúbulos subpeliculares (SAHASRABUDDHE *et al.*, 2004).

1.2.3 Flagelo

Tripanossomatídeos possuem um único flagelo que surge a partir de um corpo basal, esse é responsável pela nucleação dos microtúbulos do axonema flagelar (GULL, 1999). Ele emerge da bolsa flagelar, e além do clássico axonema, que consiste em um conjunto de nove pares de microtúbulo externo e um par central, apresenta uma estrutura paraflagelar, formada por uma rede filamentosa protéica, exclusivo dos Kinetoplastidas, e se liga através do axonema ao longo do comprimento do flagelo (Figura 4) (DE SOUZA, 2008; ROTUREAU *et al.*, 2009; GLUENZ *et al.*, 2010).

O flagelo é considerado uma organela multifuncional, pois além de promover motilidade ao parasita, também está envolvido na fixação do parasita ao intestino do vetor e apresenta função sensorial (LANDFEAR & IGNATUSHCHENKO, 2001; ROTUREAU *et al.*, 2009).

Durante o ciclo evolutivo, o flagelo mostra variações no seu comprimento e posição. As formas promastigotas possuem um longo flagelo que emerge diretamente da bolsa flagelar na porção anterior da célula. É o flagelo que auxilia o parasita a se fixar no intestino de seus hospedeiros invertebrados. Já a forma amastigota não possui a estrutura paraflagelar, o flagelo é pouco móvel, e fica contido no interior da bolsa flagelar (Figura 4) (GLUENZ, 2010).

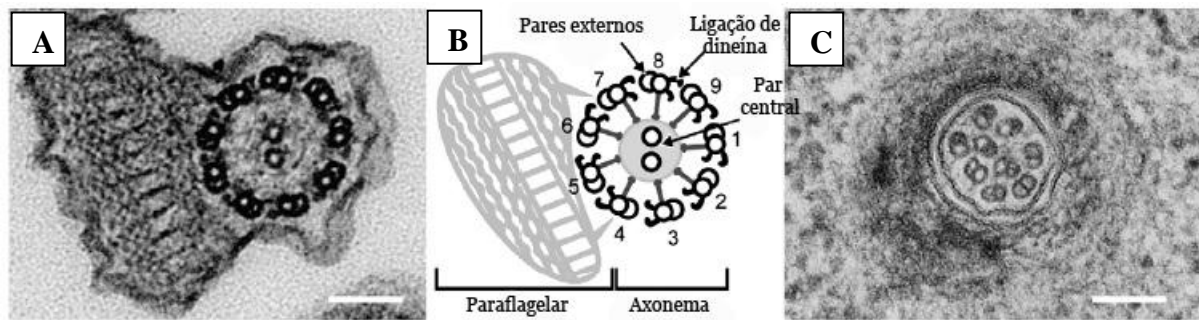


Figura 4: Estrutura do flagelo de *Leishmania* sp em promastigotas e amastigotas. (A) Axonema de promastigotas. (B) Desenho esquemático do axonema de promastigotas. (C) Axonema de amastigotas.

Fonte: GLUENZ *et al.*, 2010 (Modificada).

1.2.4 Mitocôndria e Cinetoplasto

Uma característica interessante dos protozoários tripanossomatídeos é o fato de possuírem uma única mitocôndria altamente ramificada adjacente ao corpo basal do flagelo, com distribuição por toda a célula, localizada abaixo dos microtúbulos subpeliculares apresentando-se dilatada na região onde o DNA mitocondrial (kDNA) está presente. O kDNA é uma estrutura incomum, conhecida como cinetoplasto. Suas propriedades particulares de reter corantes básicos permitiram o seu descobrimento. O kDNA representa aproximadamente 30% do total do DNA celular e está localizado dentro da matrix mitocondrial, perpendicular ao eixo do flagelo. Ele é composto por duas classes de DNA circular: os maxicírculos e os minicírculos. A extensão da mitocôndria e sua organização interna variam de acordo com a espécie de protozoários (DE SOUZA *et al.*, 2009; FIDALGO & GILLE, 2011).

As mitocôndrias possuem características que são comuns a outros organismos, por isso quando o parasito é submetido a estresse pode acarretar em danos celulares, mitocondriais e levar ao processo de morte celular por apoptose. Estudos recentes têm demonstrado a ação de várias substâncias sobre a mitocôndria do parasita levando ao processo de apoptose (FONSECA-SILVA *et al.*, 2011; GARCIA *et al.*, 2013).

1.2.5 Núcleo

O núcleo é bem definido e possui configurações variadas, tendendo a esférico ou mais frouxo, mostrando um cariossomo central ou excêntrico e a cromatina com disposição variável, e possui um nucléolo. É revestido por um envoltório em que ambas as membranas possuem poros nucleares que medem cerca de 80 nm de diâmetro. Como nas células

eucarióticas, a membrana nuclear externa apresenta continuidade com a membrana do retículo endoplasmático (DE SOUZA, 2008; MICHALICK & RIBEIRO, 2011).

1.2.6 Outras organelas

Diferentes organelas intracelulares são observadas no citoplasma de parasitas do gênero *Leishmania*. Como em outras células eucarióticas, a *Leishmania* possui retículo endoplasmático (liso e rugoso) e complexo de Golgi, organelas que estão envolvidas na síntese de lipídeos, proteínas, processo de glicosilação e sulfatação. O retículo endoplasmático está presente por todo o corpo celular e muitas vezes estão próximo aos microtúbulos subpeliculares e a mitocôndria, já o complexo de Golgi está localizado próximo à bolsa flagelar.

A *Leishmania* possui acidocalcissomos, organelas ácidas que estocam cálcio, e atuam no armazenamento de cátions e fósforos, manutenção da homeostase intracelular, pH e osmorregulação (DOCAMPO *et al.*, 2005). Dependendo da espécie podem se apresentar em maior ou menor número.

Estruturas túbulo-vesiculares são encontradas ao longo da forma promastigota de *Leishmania*. São estruturas formadas a partir de endossomas primários e pelo complexo de Golgi formando um sistema túbulo multivesicular revestido por membrana. Este sistema se estende da região anterior, próximo à bolsa flagelar, até a região posterior (WALLER & MCCONVILLE, 2002).

No citoplasma de *Leishmania* também são encontradas inclusões lipídicas, com formato esférico com diâmetro variável que são constituídos por uma monocamada de fosfolipídios. Elas possuem a função de compartimentalização e estocagem de lipídios. E há poucos estudos sobre esta organela e sua importância para o parasita (DE SOUZA *et al.*, 2009b).

Os glicossomos são organelas que correspondem a um tipo especial de peroxissomo e estão envolvidos em diferentes processos celulares, como o metabolismo de peróxido, β -oxidação de ácidos graxos, gliconeogênese, biossíntese de lipídeos (fosfolipídeos e esteróis), e sua presença é abundante em amastigotas, demonstrando variação no metabolismo dos diferentes estágios do desenvolvimento da *Leishmania* (OPPERDOES & COOMBS, 2007).

Já os megassomos são grandes estruturas, que neste protozoário têm atividade lisossomal e são ricas em cisteíno proteinases que desempenham papel importante na

sobrevivência das formas amastigotas no interior dos macrófagos. Os megassomos são o destino final de todas as macromoléculas capturadas no meio extracelular, ingeridas pelo processo endocítico do parasito. (DE SOUZA *et al.*, 2009a).

1.3 A LEISHMANIOSE

1.3.1 Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA)

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

1.3.2 Aspectos epidemiológicos, clínicos e imunológicos

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma das principais doenças transmitidas por vetores no mundo e apresenta grande magnitude e distribuição territorial. A Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que 350 milhões de pessoas estejam expostas ao risco, com registro aproximado de dois milhões de novos casos das diferentes formas clínicas ao ano. Cerca de 82 países relataram casos de leishmaniose cutânea, com uma prevalência de 10 a 1,5 milhões de novos casos por ano. O Brasil está entre os países de maior incidência das formas cutânea e mucocutânea (WHO, 2010; ALVAR, *et al.*, 2012).

No período de 2010 foram registrados no Brasil aproximadamente 22.000 de casos de leishmaniose tegumentar (Figura 5), e cerca de 32% dos casos foram registrado só na região Norte. Ainda assim o número de casos está bem menor do que aqueles registrados nos anos anteriores indicando uma possível redução de casos (BRASIL, 2011 Sinan/SVS/MS).

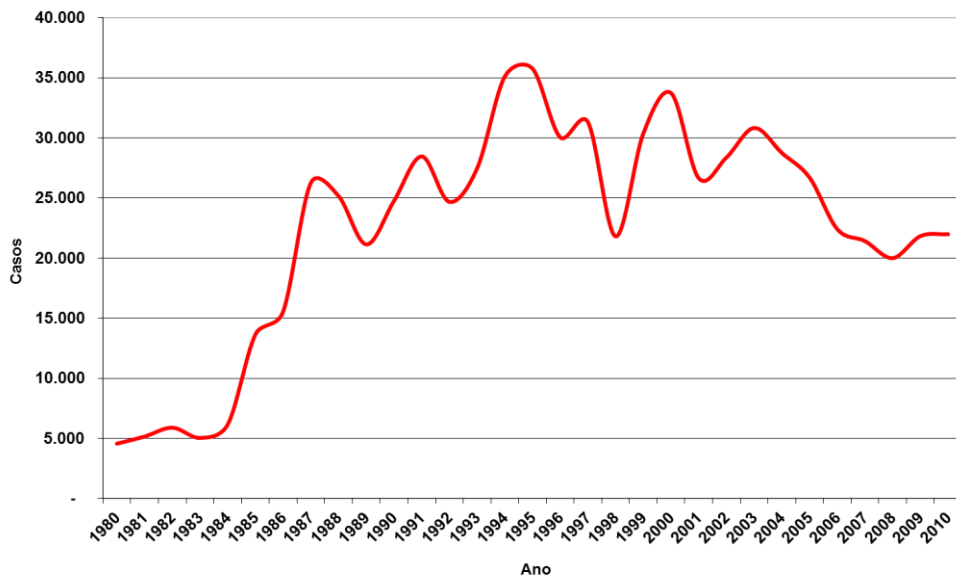


Figura 5: Casos notificados de leishmaniose tegumentar americana, Brasil – 1980 a 2010.

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

A leishmaniose tegumentar atualmente está presente em países com diferentes realidades socioculturais, onde há uma diversidade de espécies e apresenta-se em fase de expansão geográfica. Nas últimas décadas, as análises de estudos epidemiológicos demonstram mudanças no comportamento da doença. Mudanças ambientais, tais como desmatamento, construção de barragens, urbanização, e ainda aumento de viagens e migração de pessoas não-imunes para áreas endêmicas tem contribuído nessa mudança de perfil da doença (SILVA & MUNIZ, 2009; AMEEN, 2010; GOTO & LINDOSO, 2010).

A interação entre o parasita e a resposta imune do hospedeiro pode desencadear uma série de eventos responsáveis pela ocorrência de diferentes manifestações clínicas.

A LTA, popularmente conhecida como “ferida brava” ou “úlcerade-Bauru”, devido a sua complexidade pode apresentar-se em diferentes formas clínicas: (1) leishmaniose cutânea localizada (Figura 6-A), representa o acometimento primário da pele, ocorre geralmente no local da picada do inseto e é caracterizada pelo aparecimento de lesões arredondadas, geralmente indolores, podendo apresentar úlceras ou não; (2) leishmaniose mucocutânea (Figura 6-B), caracterizada pelo aparecimento de lesões destrutivas, acometendo mucosas, principalmente, na face, palato mole, faringe ou laringe; (3) leishmaniose cutâneo-difusa (Figura 6-C), constitui uma forma rara, porém grave, que ocorre em pacientes anérgicos, produz lesões cutâneas nodulares não ulceradas, múltiplas e disseminadas, contendo elevado número de amastigotas, sendo a forma disseminada a mais comum (SILVEIRA *et al.*, 2004; NYLÉN & EIDSMO, 2012).



Figura 6. Formas clínicas da Leishmaniose Tegumentar. (A) Leishmaniose cutânea localizada; (B) Leishmaniose mucocutânea; (C) Leishmaniose cutâneo-difusa.

Fonte: SILVEIRA *et al.*, 2004.

A espécie *Leishmania (L.) amazonensis*, é considerada o agente de duas formas distintas da Leishmaniose cutânea: A leishmaniose cutânea localizada (LCL) e a Leishmaniose cutânea difusa (LCD), forma mais severa e de difícil tratamento.

A LCD é descrita em alguns países dos continentes americano e africano, apresentando um evolução crônica, com capacidade de produzir deformidades em extremidades, e acomete pacientes considerados anérgicos, com deficiência específica na resposta imune celular contra a *Leishmania* (COSTA *et al.*, 2005).

Os diferentes tipos de Leishmaniose cutânea são caracterizadas por uma resposta imune mediada por células T $CD4^+$ E $CD8^+$. As células $CD4^+$ têm uma função central no sistema imune, promovendo respostas adaptativas adequadas. Estas células podem ser divididas em duas subpopulações: Th-1 e Th-2, cada um dos quais expressa diferentes tipos de citocinas.

Pacientes com a forma cutânea localizada (LCL) desenvolvem ativação de linfócitos Th-1, na região da lesão, enquanto, aqueles com a forma mucocutânea apresentam ativação mista de linfócitos Th-1 e Th-2. Entretanto, pacientes infectados por *L. (L.) amazonensis* que desenvolvem a forma clínica LCD, a resposta imune é predominantemente do tipo Th-2, onde há maior expressão de IL-10, IL-4, IL-5, citocinas que inibem a ativação de macrófagos e contribui para a sobrevivência do parasita, o que difere de uma resposta tipo Th-1 que produz citocinas como: IL-2, IL-12 e $INF-\gamma$, que favorecem a ativação de macrófagos e conseqüente eliminação do parasita (SILVEIRA *et al.*, 2009; PIRES *et al.*, 2010; MOUGNEAU *et al.*, 2012; NYLÉN & EIDSMO, 2012).

O infiltrado inflamatório na LCD é rico em macrófagos vacuolados com elevada carga parasitária, mas apesar do grande número dessas células é escassa ou ausente a expressão de TNF-alfa e há inibição da enzima óxido nítrico sintase induzida (INOS)

(NYLÉN & EIDSMO, 2012).

Na ausência de uma resposta imune celular efetiva contra o parasito, este se multiplica sem controle, aumentando o número de lesões e expandindo sua distribuição na superfície corporal.

1.5 INTERAÇÃO PARASITO – HOSPEDEIRO

As espécies do gênero *Leishmania* são parasitas intracelulares obrigatórios e apresentam tropismo por fagócitos mononucleares (macrófagos), podendo infectar também fibroblastos, células dendríticas e neutrófilos (SILVA, 2010; CHARMOY *et al.*, 2010).

Os macrófagos desempenham uma função importante na defesa do organismo contra patógenos e são fagócitos que têm como principal função destruir e eliminar os microorganismos (ABBAS *et al.*, 2012).

Ao entrar em contato com o agente infeccioso sofrem alterações morfológicas características da ativação celular, o complexo de Golgi fica bem desenvolvido, lisossomos abundantes e retículo endoplasmático proeminente, alterações que são acompanhadas do rearranjo que ocorre no citoesqueleto (GRUENHEID & FINLAY, 2003; SMIT *et al.*, 2008; LÁZARO-DIÉGUEZ *et al.*, 2008; PATEL & HARRISON, 2009).

Em resposta à estimulação de vários agentes, eles produzem uma série de produtos citotóxicos incluindo espécies reativas de oxigênio (ROS), como ânions superóxidos (O_2^-), radicais hidroxila (OH), peróxido de hidrogênio (H_2O_2), em um fenômeno denominado “burst oxidativo”, e também ocorre produção de óxido nítrico (NO). O NO é produzido através da ativação da iNOS que converte a L-arginina em NO e L-citrulina (Figura 7) (MOSSER & EDWARDS, 2008; HEINSBROEK & GORDON, 2009).

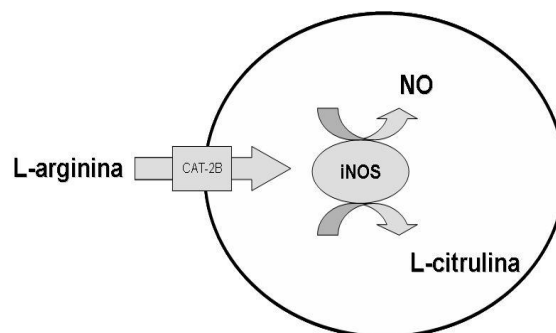


Figura 7. Mecanismo esquemático da ação da enzima iNOS. A L-arginina é transportada por uma proteína de membrana para o interior da célula, sendo convertida em NO e L-citrulina pela enzima iNOS.

Embora os macrófagos sejam células fagocitárias especializadas no combate a agentes infecciosos, protozoários do gênero *Leishmania* desenvolveram mecanismos de defesa capazes de subverter sua capacidade microbicida, conseguindo sobreviver neste ambiente potencialmente tóxico e multiplicar-se até a ruptura da célula, quando são liberadas para infectar outros macrófagos, propagando a infecção (LIU & UZONNA, 2012).

O processo de fagocitose inicia-se com o reconhecimento do parasito através de receptores presentes na membrana dos macrófagos. Os parasitas não conseguem penetrar ativamente nessas células, por isso necessitam da sua ação fagocítica, principalmente através de interação entre receptores celulares do hospedeiro (CR1, CR3, manose-fucose), e moléculas de superfície do microorganismo, como os lipofosfoglicanos (LPG) e a glicoproteína (GP63). Estas duas moléculas são os constituintes majoritários da superfície das promastigotas (Figura 8) (CUNNINGHAM *et al.*, 2002; MOUGNEAU *et al.*, 2012; LIU & UZONNA, 2012).

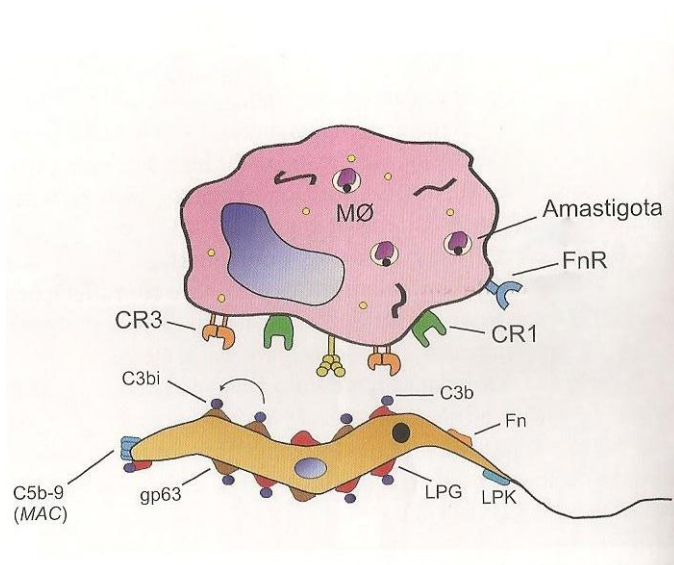


Figura 8: Reconhecimento das formas promastigotas por macrófagos. Evidenciando a interação entre moléculas superficiais do parasita.

Fonte: PASSERO *et al.*, 2011

A glicoproteína GP63 é uma metaloprotease encontrada em toda a superfície das promastigotas. Esta glicoproteína é zinco-dependente, com uma vasta gama de substratos, como: a caseína, gelatina, albumina, hemoglobina e fibrinogênio. A GP63 torna as formas promastigotas resistentes a ação mediada pelo sistema complemento, são responsáveis por clivar a molécula C3b em C3bi, sua forma inativa, impedindo a formação do complexo de ataque à membrana (MAC) do sistema complemento. Em formas amastigotas, a GP63 confere

a capacidade de degradar enzimas lisossômicas por apresentar ótima atividade em meio ácido, presente nos fagolisossomos (CHANG & MCGWIRE, 2002; OLIVER *et al.*, 2005).

Após a internalização nos macrófagos, os parasitos ficam dentro de um vacúolo parasitóforo (fagolisossoma) que os separa do citoplasma. Esta organela deriva da fusão do fagossoma com os lisossomos (DIAKONOVA *et al.*, 2002; TANAKA *et al.*, 2007).

O LPG é um glicolípido composto de repetidas unidades de dissacarídeos ligados a uma cauda de fosfatidilinositol através de um núcleo hexasacarídico fosforilado. Esta molécula, assim como a GP63, confere resistência à *Leishmania* no que diz respeito à ação lítica do complemento (JOSHI *et al.*, 2002; RASMUSSEN & DESCOTEAUX, 2004). Durante a fase inicial da infecção intracelular, a molécula de LPG seria responsável por retardar a fusão do fagossomo, contendo o parasita, com os lisossomos (NADERER & MCCONVILLE, 2008). Isso sugere que o LPG contribui para que as promastigotas resistam às condições existentes no interior do vacúolo parasitóforo, durante o período necessário para que ocorra a diferenciação das formas promastigotas em amastigotas. Estes mecanismos demonstram que o protozoário é capaz de manipular as funções de sua célula hospedeira de várias maneiras (RASMUSSEN & DESCOTEAUX, 2004).

Parasitas do gênero *Leishmania* utilizam eficazmente a resposta imune do hospedeiro para o estabelecimento da infecção dentro dos macrófagos. Uma vez fagocitados, eles manipulam o ambiente hostil através da inibição de enzimas hidrolíticas, produtos metabólicos tóxicos, sinalização celular, produção de citocinas, e outros eventos. Essas estratégias permitem a sobrevivência do parasita no interior da célula hospedeira e a progressão da doença (CUNNINGHAM *et al.*, 2002).

Diversos estudos foram realizados a fim de desvendar maiores detalhes acerca dos fatores de virulência envolvidos na manutenção e interação do parasito com sua célula hospedeira. Acredita-se que este seja um dos caminhos para o desenvolvimento de fármacos e vacinas contra a Leishmaniose (OKWOR & UZONNA, 2009).

1.6 TRATAMENTO DAS LEISHMANIOSES

Atualmente não existe uma vacina contra leishmaniose, e o tratamento é realizado utilizando-se uma variedade de drogas (BAILEY & LOCKWOOD, 2007; OKWOR & UZONNA, 2009). Embora existam várias espécies de *Leishmania* e diversas manifestações clínicas da doença, os mesmos medicamentos são utilizados para tratar a doença (GOTO & LINDOSO, 2010).

O tratamento da leishmaniose é feito principalmente com antimoniais pentavalentes: antimoniato de N-metil glucamina (Glucantime®) e estibogluconato de sódio (Pentostan®), que são drogas de primeira escolha para o tratamento de todas as formas clínicas da leishmaniose (FRÉZARD & DEMICHELI, 2010). No entanto, nos últimos anos, ocorreu um aumento da resistência aos antimoniais, e a razão para surgimento de resistência foi o uso indiscriminado do medicamento (ASHUTOSH *et al.*, 2007; PALUMBO, 2010). Além disso, essas drogas necessitam de injeções diárias, têm custo elevado, alta toxicidade causando efeitos adversos nos pacientes, incluindo, pancreatite, mialgias, fadiga, náuseas e dor de cabeça, além disso, é contra indicado para pacientes cardiopatas, nefropatas e hepatopatas e, por serem abortivos, não devem ser administrado a gestantes (PATEL & SETHI, 2009; CHAKRAVARTY & SUNDAR, 2010).

Não havendo resposta satisfatória ou sendo detectada resistência aos antimoniais pentavalentes, as drogas de segunda escolha são as anfotericinas e pentamidinas (BRASIL, 2010). A anfotericina B é um antibiótico poliênico que possui atividade seletiva sobre *Leishmania* devido à alta afinidade ao ergosterol, um esterol prevalente na membrana desse parasita (POLONIO & EFFERTH, 2008).

Outra formulação da droga, a Anfotericina B Lipossomal, também está sendo utilizada (CROFT *et al.*, 2006). Nesta formulação, a droga atinge níveis plasmáticos mais elevados que a Anfotericina B convencional. No Brasil, essa droga está registrada na Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para uso no tratamento da leishmaniose visceral (BRASIL, 2010). Wortmann *et al.* (2010) observaram que o tratamento com Anfotericina B lipossomal demonstrou eficácia contra leishmaniose cutânea e pode ser uma alternativa viável, porém tem custo elevado. Já as pentamidinas, são diamidinas aromáticas, que apresentam eficácia contra algumas espécies de *Leishmania* do Novo Mundo como *L. panamensis* e *L. guyanensis* (BAILEY & LOCKWOOD, 2007; BLUM & HATZ, 2009), além da eficácia no tratamento da Leishmaniose visceral (LV). Esta droga interfere na síntese de DNA, modificando a morfologia do cinetoplasto, e fragmentando a membrana mitocondrial do parasita (GOTO & LINDOSO, 2010).

Uma nova droga, inicialmente desenvolvida para tratamento de câncer, a miltefosina, teve sua atividade leishmanicida descoberta no ano de 1980. Esta droga atua interferindo na membrana celular do parasita, sem interagir com o DNA, modula a composição lipídica, a permeabilidade e fluidez da membrana, assim como o metabolismo de fosfolipídeos, induzindo morte celular por apoptose (COSTA FILHO *et al.*, 2008). Estas descobertas levaram a ensaios clínicos na Índia em 2002, para o tratamento oral da

Leishmaniose Visceral (MITROPOULOS *et al.*, 2010). Soto *et al.* (2001) observaram que após o tratamento com miltefosina de pacientes colombianos com LT, a taxa de cura foi de 91%, enquanto que em outro trabalho realizado com pacientes da Guatemala, a taxa de cura foi de 53% (SOTO & BERMAN, 2006).

Várias drogas encontram-se em diferentes estágios de desenvolvimento, como Sitamaquina, Itraconazol, Cetoconazol, Fluconazol e Paromomicina (CROFT & COOMBS, 2003; GARNIER *et al.*, 2006; BARONI *et al.*, 2009; KIM *et al.*, 2009; SKLAVOS *et al.*, 2010; EL-SAYED & ANWAR, 2010). A Paromomicina é um antibiótico do grupo aminoglicosídeo, foi identificado com potencial leishmanicida em 1960 e desde então tem sido utilizado em ensaios clínicos para o tratamento da LT e LV, de maneira tópica e parenteral (KRAUSE & KROEGER, 1994; ASILIAN *et al.*, 2003; SUNDAR *et al.*, 2007).

1.7 BIOPRODUTOS COM AÇÃO LEISHMANICIDA

Além dos tratamentos com quimioterápicos, extratos e óleos provenientes de plantas estão sendo estudados, principalmente na região Amazônica, devido à grande biodiversidade natural, através deles é possível encontrar classes de metabólitos com atividades contra o protozoário (BRAGA *et al.*, 2007; POLONIO & EFFERTH, 2008).

Com os produtos de origem vegetal há uma infinidade de estudos relatando o seu efeito anti-Leishmania. Estudos realizados por Ueda-Nakamura *et al.* (2006) demonstraram que o óleo essencial rico em Eugenol, da planta *Ocimum gratissimum* mostrou ação leishmanicida, não apresentando efeito citotóxico à célula hospedeira. Outro óleo proveniente das folhas de *Cymbopogon citratus*, amplamente utilizado pelas indústrias de perfumes e cosméticos, foi capaz de inibir o crescimento de formas promastigotas de *L. amazonensis* após 72 horas de incubação (SANTIN *et al.*, 2009).

Os extratos de raiz, frutos e folhas de plantas também apresentam atividade contra vários protozoários (CABRAL *et al.*, 2010; LUSAKIBANZA *et al.*, 2010). *Peschiera australis* é uma planta encontrado no Brasil e em outros países da América, e seu extrato foi testado *in vitro* e os resultados obtidos mostraram sua eficácia contra formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* por Delorenzi *et al.* (2001).

Rosa *et al.* (2003) observaram que um óleo essencial, proveniente da raiz da planta *Croton cajucara* mostrou ação leishmanicida, e foi capaz de matar 100% dos parasitas, além de causar alterações ultraestruturais nessas células. Posteriormente, Brenzan *et al.* (2007), ao investigar o extrato diclorometano das folhas de *Calophyllum brasiliense*, uma

planta rica em xantonas e cumarinas, demonstraram sua eficácia contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*. Assim como o extrato metanólico de *Baccharis trimera* parece ser eficaz contra algumas espécies que causam LT (TEMPONE *et al.*, 2008). Já o extrato orgânico de *Mikania micrantha* teve sua ação comprovada contra *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania braziliensis* (LAURELL *et al.*, 2012)

A variedade de tratamentos atualmente disponíveis demonstra que ainda não existe uma terapia eficaz para o combate à LT (BAILEY & LOCKWOOD, 2007) e muitos estudos ainda estão sendo realizados para o desenvolvimento de drogas eficazes, de baixo custo e que possam ser utilizadas em doses mínimas.

1.8 *Physalis Angulata*

O gênero *Physalis* pertence à Família Solanaceae e abrange cerca de 120 espécies. *Physalis angulata* é mais representativa das espécies do gênero *Physalis*, uma planta distribuída ao longo de regiões tropicais e subtropicais do mundo, principalmente nas Américas Central e Sul, possui características herbáceas e hábitos perenes (Figura 9). Na Amazônia essa planta é popularmente conhecida como “camapú”, palavra de origem tupi. É encontrada em hortas, jardins e quintais, sendo que seu uso é amplamente difundido na medicina popular (LORENZI & MATOS, 2002; BASTOS *et al.*, 2008; BALBANI *et al.*, 2009).



Figura 9: (A) Planta *Physalis angulata* e (B) Fruto da planta.

Fonte: (A) Laboratório de Parasitologia, 2010. (B) Guimarães, 2005

A espécie *P. angulata* é exclusivamente produtora de seco-esteróides altamente oxigenados, chamadas fisalinas que são moléculas derivadas esteroidais de estruturas bastante complexas principalmente pela pluralidade de anéis que este grupo de vitasteróides apresenta (Figura 10) (TOMASSINI *et al.*, 2000; MAGALHÃES *et al.*, 2006).

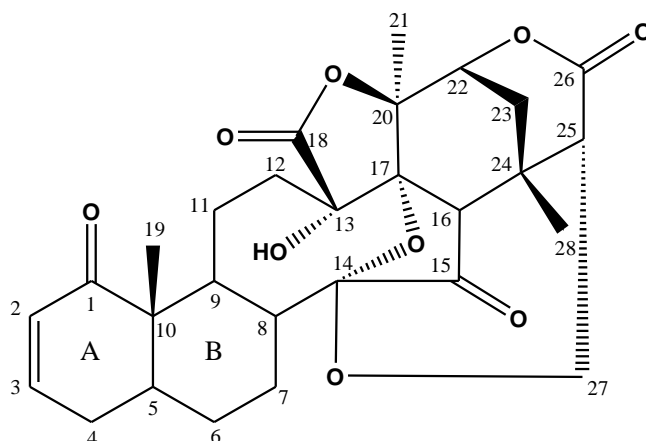


Figura 10: Esqueleto básico das Fisalinas

Fonte: TOMASSINI *et al.*, 2000.

Esta planta é amplamente utilizada na medicina tradicional como analgésico, anti-reumático, para tratamento de dor de garganta e dor abdominal. É considerada como antipirético e antiinflamatório para a hepatite e cervicite (LIN *et al.*, 1992; BASTOS *et al.*, 2008).

O chá da planta é recomendado na forma de banho para reumatismo e males de fígado. Seu suco é utilizado como calmante, depurativo e para o alívio da dor de ouvido. Seus frutos são utilizados como desobstruentes e diuréticos. Já as folhas são utilizadas no tratamento de inflamações na bexiga, baço e icterícia, sendo ainda empregadas no tratamento de malária e hepatite (LORENZI & MATOS, 2002).

Choi & Hwang (2003) demonstraram que o extrato metanólico das flores de *P. angulata*, exibiu ação antiinflamatória em edema de pata induzida por carragenina. Posteriormente, Bastos *et al.* (2008) também observaram que o extrato aquoso da raiz de *P. angulata* foi capaz de controlar a resposta inflamatória induzida pela injeção subcutânea de carragenina a 1% , em modelos de inflamação de bolsa de ar. Além disso, o extrato foi capaz de interferir na via da enzima ciclooxigenase, proliferação de linfócitos e produção de NO e TNF- β .

Estudos realizados por Soares *et al.* (2003), mostraram que as Fisalinas B, F e G, mas não D, purificadas do caule e folhas de *P. angulata*, causaram uma redução na produção de NO em macrófagos estimulados com LPS e Interferon- γ . Porém estudos conduzidos por Lee *et al.* (2009) mostraram que o extrato aquoso de *P. angulata* estimula a produção ROS em células cancerígenas da mucosa oral. E mais recentemente Wu *et al.*, (2012) demonstraram que a fisalina F induz apoptose de células humanas de carcinoma renal via produção de ROS.

Sua ação sobre microorganismos patogênicos também foi investigada por diversos autores. Cáceres *et al.* (1995) demonstraram que o extrato hidroalcoólico, obtido das folhas da planta, apresentava ação sobre culturas de *Neisseria gonorrhoea* resistentes a penicilina. Em outro estudo foi verificado que o extrato aquoso e metanólico inibiram o crescimento de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (SANCHES *et al.*, 1997; SILVA *et al.*, 1999).

Posteriormente, Hwang *et al.* (2004) demonstraram a ação antibacteriana do extrato metanólico das flores da espécie contra a cepa de *Streptococcus mutans*, uma das principais bactérias causadoras da cárie dentária. Além da ação antimicrobiana, o extrato apresentou atividade tripanossomicida descrita por Freiburghaus *et al.* (1996). Esses autores utilizaram o extrato diclorometânico do caule em cultura de *Trypanosoma brucei rhodesiense*.

Sua ação sobre o protozoário *Leishmania* foi demonstrada por Choudhary *et al.* (2006). Esses autores isolaram a fisalina H da espécie *Physalis minima*, e produziram a partir dela, duas novas fisalinas e observaram que ambos os compostos apresentaram atividade leishmanicida contra promastigotas de *Leishmania major*. Recentemente, Guimarães *et al.* (2009), investigaram a atividade leishmanicida das fisalinas B e F obtidas de *P. angulata*, em modelos de leishmaniose cutânea *in vitro* e *in vivo*. Esses autores observaram que as fisalinas B e principalmente a F foram capazes de reduzir o percentual de macrófagos infectados com *Leishmania amazonensis* e *Leishmania major*, reduzindo o tamanho da lesão e ausência de efeito citotóxico para a célula hospedeira.

Além disso, estudos realizados por Pinto *et al.* (2010) observaram que a fisalina E isoladas do extrato etanólico foi eficaz no tratamento tópico de dermatite crônica e aguda.

Entretanto, não existem trabalhos na literatura sobre a ação do extrato aquoso da raiz da planta sobre formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania* e sua ação na célula hospedeira.

2. JUSTIFICATIVA

As leishmanioses são consideradas pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010) como uma das seis maiores endemias, infectando cerca de dois milhões de pessoas no mundo todo.

O Brasil está entre os cinco países com maior número de casos desta endemia, representando um grave problema de saúde pública, com destaque para a região Norte, que em 2010 foram registrados cerca de 32% dos casos (BRASIL, 2011 em Sinan/SVS/MS).

O perfil da doença no país está mudando, devido à expansão humana para áreas endêmicas florestais, de uma zoonose transmitida acidentalmente ao homem, para uma doença de interface rural-urbana (CHAGAS *et al.*, 2006). Na região Norte o aumento na incidência dos casos está ocorrendo devido ao processo de exploração da Amazônia.

Devido ao aumento da ocorrência de casos de Leishmaniose, uma diversidade de medicamentos está sendo desenvolvida com a finalidade de ativar a célula hospedeira, sem causar efeitos colaterais e ao mesmo tempo inibir os mecanismos desenvolvidos pelo parasito para burlar a resposta imune das células fagocíticas.

A inibição do crescimento ou a destruição da *Leishmania* dentro de macrófagos é um mecanismo fundamental para eliminar ou reduzir a infecção. Porém, alguns protozoários são capazes de evadir desta resposta microbicida, sobreviver e se proliferar dentro dos macrófagos (MAITY *et al.*, 2009) como, a espécie, *Leishmania (L.) amazonensis*.

A planta *Physalis angulata* é amplamente distribuída em regiões tropicais e subtropicais no mundo, e bastante utilizado na medicina popular na região Amazônica (MAGALHÃES *et al.* 2006). O extrato da planta e composto purificados são alvo de estudos em todo mundo (PINTO *et al.*, 2010; LORENZI *et al.*; 2002; LEE *et al.*, 2009).

A purificação de determinados componentes pode melhorar a ação dos compostos, porém o rendimento das frações isoladas é extremamente baixo, o custo dessa purificação é elevado e isso de certa forma inviabiliza estudos subsequentes. Na medicina tradicional plantas inteiras ou misturas de plantas são utilizadas, em vez de compostos isolados (RASOANAIVO *et al.*, 2011).

Sendo assim, buscou-se determinar os efeitos desse extrato sobre o protozoário *Leishmania* e o seu papel sobre macrófagos e ainda, durante a interação desses parasitos com a célula hospedeira.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVO GERAL

Analisar os efeitos do extrato aquoso da raiz da planta *Physalis angulata* sobre o protozoário *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e a célula hospedeira.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar a atividade do extrato sobre as formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*;
- Avaliar os efeitos do extrato sobre a morfológica e ultraestrutura de formas promastigotas de *L.(L.) amazonensis*;
- Determinar a produção de radicais superóxidos da célula hospedeira infectada e tratada com o extrato;
- Analisar a exposição de Fosfatidilserina e volume celular de promastigotas de *L.(L.) amazonensis* após tratamento com o extrato;
- Analisar a viabilidade da célula hospedeira tratadas com o extrato;
- Avaliar alterações morfológicas e ultraestruturais da célula hospedeira tratada com o extrato;
- Analisar os componentes do citoesqueleto (actina e microtúbulos) da célula hospedeira tratada com o extrato;

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO E DILUIÇÃO DO EXTRATO AQUOSO DA RAÍZ DA PLANTA

P.angulata

O processo de extração foi realizado no Laboratório de Neuroquímica do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal do Pará, segundo o protocolo previamente estabelecido por Bastos *et al.*, (2008). A solução estoque do extrato aquoso (1 mg/mL) da raiz da planta *Physalis angulata* foi diluído em meio DMEM ou RPMI . A concentração final utilizada para cada experimento foi obtida a partir dessa solução.

4.2 ELUCIDAÇÃO ESTRUTURAL DO EXTRATO AQUOSO

A análise do extrato aquoso da raiz de *Physalis angulata* por espectrometria de massa foi realizada pelo LABCROL/UFGA em equipamento ultrOTOFG –ESI-TOF Bruker Daltonics, Billerica, MA, USA e em equipamento micrOTOFG-Q II. (Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Departamento de Física e Química).

4.3 CULTIVO E MANUTENÇÃO DO PARASITO

Leishmania (Leishmania) amazonensis (IFLA/67/BR/PH8) foram obtidas em meio NNN do Programa de Leishmanioses do Instituto Evandro Chagas. Posteriormente, as formas promastigotas foram mantidas em meio RPMI 1640, suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal (SBF) em estufa B.O.D (*Biological Oxygen Demand*) à 27°C. Foram realizados repiques semanais até um total de seis passagens, garantindo a infectividade dos parasitos. As promastigotas utilizadas em fase exponencial de crescimento estão no quarto dia de crescimento, enquanto que as consideradas em fase estacionária de crescimento estão no sétimo dia de crescimento.

4.4 OBTENÇÃO E CULTIVO DA CÉLULA HOSPEDEIRA

Macrófagos peritoneais foram obtidos a partir de camundongos albinos (*Mus*

musculus). O lavado peritoneal foi feito após a injeção de 5 mL de solução de Hanks estéril no peritônio de animais previamente anestesiados e sacrificados.

O material aspirado foi concentrado por centrifugação a 4 °C. Os macrófagos foram transferidos para garrafas ou placas de cultura de 12 e/ou 24 poços e incubados a 37 °C em estufa contendo 5% de CO₂ e 95% de O₂, durante 1 hora para adesão em garrafa, placa de cultura ou em lamínula de acordo com o experimento.

Após esse tempo foi feita lavagem com solução salina de fosfato estéril (PBS) pH 7.2 para remoção de células não aderentes e, em seguida, adicionado meio DMEM suplementado com 10% de SBF. Os animais foram sacrificados de acordo com as normas do Comitê de Ética (processo n° BIO001-09 CEPAE/ICB/UFPA) e acondicionados em recipientes plásticos apropriados e despejados em *containers* para coleta seletiva de material biológico.

4.5 ATIVIDADE LEISHMANICIDA

4.5.1 Atividade antipromastigota

Cultivos de promastigotas em fase exponencial de crescimento foram utilizados para os testes com o extrato de *P. angulata*. Os parasitos foram adicionados aos poços de cultura em uma concentração de 1×10^6 parasitos por mL. O extrato foi adicionado em concentrações de 10, 20, 50 e 100 µg/mL obtidas a partir da diluição estoque (1mg/mL) em meio RPMI, em placas de 24 poços.

Foram retiradas alíquotas para contagem em câmara de Neubauer nos tempos de 24, 48, 72 e 96h após a adição do extrato. A contagem foi realizada em microscópio óptico Olympus BX41 para comparação do crescimento de parasitos tratados em diferentes concentrações do extrato em relação aos parasitos não tratados. Em todos os experimentos foi utilizado controle sem adição do extrato. Todos os testes foram realizados em triplicata. Como controle positivo foi utilizado, Glucantime®, droga padrão para o tratamento da Leishmaniose.

4.5.2 Atividade antiamastigota

Os macrófagos peritoneais de camundongos utilizados no ensaio foram obtidos como descrito no item 4.4. Para observar o efeito do extrato sobre as formas amastigotas no

interior da célula hospedeira os parasitos obtidos na fase estacionária de crescimento foram colocados em contato com macrófagos na concentração de 5×10^5 células por poço na proporção de 10 parasitos por macrófagos, durante 3 horas à temperatura de 37 °C em atmosfera de 5% de CO₂.

As células infectadas foram, posteriormente, tratadas com o extrato em concentrações de 20, 50 e 100 µg/mL por 1 hora durante três dias. Após este período, as lamínulas contendo os macrófagos infectados foram lavadas com PBS pH 7,2 a temperatura ambiente, e fixados com formadeído 4% por 30 minutos. O fixador foi removido e as células lavadas. Em seguida, as células foram coradas com Giemsa por 1h. Após este tempo, as lamínulas foram lavadas com água para retirar todo o corante e submetidas à desidratação em soluções contendo acetona e xilol em proporções crescentes até duas passagens de finais em xilol puro. Ao final, as lamínulas foram montadas sobre lâmina de vidro utilizando *Entellan*® como meio de montagem e analisadas em microscópio óptico de campo claro Olympus BX41.

Foram contados 100 macrófagos por lamínula e o índice endocítico foi obtido calculando-se a porcentagem de células que endocitaram e a média de parasitas por células.

O IC₅₀ (concentração mínima necessária para inibir 50% do crescimento) para formas promastigotas e amastigotas intracelulares foi determinada a partir do programa SigmaPlot (version 12).

4.6 ANÁLISE DA EXTERNALIZAÇÃO DE FOSFATIDILSERINA E VOLUME CELULAR DE PROMASTIGOTAS TRATADAS

Para avaliar se a morte das promastigotas estaria ocorrendo por apoptose, estas formas foram tratadas com 50 e 100 µg/mL do extrato por 72h. Após o tratamento foram centrifugadas, lavadas em PBS (pH 7.2), ressuspendidas e incubadas com Anexina V (Alexa-Fluor, 488) em tampão de ligação filtrado (10mM de Hepes pH 7.4, 150mM de NaCl, 5 mM de KCl, 1mM de MgCl₂ e 1,8mM de CaCl₂) por 30 minutos no escuro a 25 °C. Subsequentemente, foram incubadas com iodeto de propídio (IP) (Sigma, 10 µM), por 15 minutos, para evidenciar os parasitos mortos, uma vez que a ligação deste ao material genético do parasito demonstra a permeabilidade da membrana caracterizando uma célula inviável. A seguir cada amostra foi avaliada quantitativamente por citômetro de fluxo BD FACSCantoII e por software BD FACSDiva. E para avaliar o volume celular histogramas foram gerados utilizando o parâmetro FSC (*Forward Scatter*) de parasitas tratados com 100 µg/mL com o extrato.

4.7 AVALIAÇÃO MORFOLÓGICA E ULTRAESTRUTURAL DE PROMASTIGOTAS TRATADAS COM O EXTRATO

4.7.1 Microscopia Óptica

Formas promastigotas foram cultivadas e tratadas com o extrato nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. Após 3 dias de tratamento, os parasitas foram fixados e corados com Giemsa, diluído a 10 % em água destilada, durante 1 hora à temperatura ambiente. Após esse período, as células foram desidratadas em acetona 100% e passadas em misturas crescentes de acetona-xilol, até duas passagens finais em xilol puro.

As lamínulas foram, então, montadas em lâminas de vidro com *Entellan*®. A análise morfológica foi feita em microscópio óptico Axiostar plus (Zeiss) e as imagens obtidas em câmera digital modelo Power Shot A650IS (Laboratório de Ultraestrutura Celular “Hertha Meyer” do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ).

4.7.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Parasitas foram cultivados, tratados como descrito no item 4.5.1 e fixados em solução de 2,5 % de glutaraldeído em tampão cacodilato de sódio 0,1 M, pH 7,2. Após a fixação as células foram lavadas e depositadas em lamínulas de vidro tratadas com uma solução de 0.1% de poli-L-lisina para adesão dos parasitas.

A pós-fixação foi realizada com solução contendo 1% tetróxido de ósmio e ferrocianeto de potássio por 15 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, foi realizada desidratação em uma série etanólica (Merck) crescente a 15, 20, 30, 50, 70, 90% (10 minutos cada etapa) e 100% (3 vezes durante 10 minutos). As amostras foram secas pelo método do ponto crítico (Modelo K 850 - Marca EMITECH) usando CO₂.

As lamínulas foram fixadas em suporte apropriado e metalizadas com uma película de platina de aproximadamente 2nm de espessura, usando o aparelho *Emitech K550-England*. As células foram analisadas em microscópio eletrônico de varredura LEO 1450VP (Instituto Evandro Chagas). Como controles foram utilizados promastigotas sem tratamento.

4.7.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Parasitas em fase exponencial de crescimento foram utilizados para os testes com

o extrato. Os parasitos foram adicionados às garrafas de cultura em uma concentração de 1×10^6 parasitos por mL. O extrato foi adicionado em concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$. Após 3 dias de cultivo os parasitos tratados, foram centrifugados e fixados em uma solução contendo 2,5% de glutaraldeído a 25%, 4% de paraformaldeído, 2,5% de sacarose, em tampão cacodilato de sódio 0.1 M, pH 7.2. Após a fixação as células foram lavadas 3 vezes em tampão cacodilato 0.1 M e posteriormente incubadas em solução contendo 1% tetróxido de ósmio, ferrocianeto de potássio 0,8% por 1 hora à temperatura ambiente. As células foram lavadas três vezes em tampão cacodilato 0,1 M e então desidratadas em série crescente de acetona durante 10 minutos à temperatura ambiente.

Após a desidratação as células foram lentamente impregnadas em resina Epon nas seguintes concentrações: 2:1, 1:1 e 1:2 (acetona 100%: Epon - 12 horas em cada etapa). A seguir, o material foi colocado em Epon puro por 6 horas e depois no suporte para polimerização a 60°C por 48 horas. Os blocos polimerizados foram cortados em ultramicrótomo (Leica EM UC6) e os cortes obtidos foram contrastados durante 20 minutos com acetato de uranila 5%, e, posteriormente, durante 5 minutos com citrato de chumbo e observados em Microscópio Eletrônico de Transmissão LEO 906 E.

4.8 DETECÇÃO DA VIABILIDADE CELULAR DA CÉLULA HOSPEDEIRA TRATADA COM O EXTRATO

4.8.1 Método Thiazolyl Blue (MTT)

O MTT, um sal tetrazolium solúvel em água, é convertido pelas desidrogenases mitocondriais em cristais azuis de formazan insolúveis em água. O produto formazan é impermeável às membranas celulares, acumulando-se em células viáveis, sendo posteriormente diluído em DMSO (FOTAKIS & TIMBRELL, 2006).

Macrófagos foram cultivados como descrito no item 4.2 em placas de 96 poços e submetidos ao tratamento com concentrações de 10 a 400 $\mu\text{g/mL}$ do extrato. As células foram tratadas por 1 hora, depois lavadas duas vezes com PBS e incubadas novamente em meio DMEM e 10% SBF por 24 horas.

O sobrenadante foi retirado e os poços lavados com PBS. Logo após a lavagem, foi adicionado 0,5 mg/mL MTT diluído em PBS sendo, posteriormente, incubados à 37°C em atmosfera contendo 5% de CO_2 por 3 horas. Após o término de incubação, foi retirado o sobrenadante, lavado uma vez com PBS e adicionado 200 μL DMSO em cada poço para

solubilização dos cristais de formazan e a placa foi incubada em agitação por 10 minutos.

Posteriormente, a solução resultante foi lida em leitor de ELISA (BIO-RAD Model 450 Microplate Reader) em um comprimento de onda de 570 nm. Como controle positivo, as células foram mortas com solução de 10% de formol em PBS.

4.8.2 Detecção de Potencial da Membrana Mitocondrial (JC-1)

O JC-1 é um marcador fluorescente que mensura o potencial da membrana mitocondrial das células ($\Delta\Psi$) vivas. A perda de potencial de membrana mitocondrial é utilizada como indicador inicial do processo de apoptose. O JC-1 possui vantagens sobre outros corantes catiônicos, pois pode penetrar na mitocôndria conforme variações no potencial de membrana. O JC-1 possui formas conhecidas como “J- agregados” que coram células não-apoptóticas com fluorescência vermelha intensa. Por outro lado, células apoptóticas com baixo $\Delta\Psi$, permanecem na forma monomérica, apresentando apenas fluorescência verde (PERELMAN *et al.*, 2012).

Macrófagos foram cultivados em placas de cultura de 24 poços contendo lamínulas e submetidos ao tratamento por 1 hora com 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do extrato e incubadas por 24 horas. Em seguida, foram incubados por 30 min com 10 mM de JC-1 à 37°C, lavados com PBS, observados e fotografados em Microscópio Confocal Pascal LSM-510 (Zeiss).

Para a análise quantitativa as células depois de cultivadas e tratadas foram raspadas e centrifugadas a 1500 rpm por 10 minutos, sendo ressuspensas em solução de PBS pH 7,2. Em seguida, foram centrifugadas novamente a 1500 rpm por 10 minutos e incubadas por 30 min com 10 mM de JC-1 a 37°C. Posteriormente, foram feitas lavagens com PBS e a análise foi realizada utilizando citômetro de fluxo BD FACSCantoII TM em comprimento de onda de excitação 488 nm, sendo que os monômeros de JC-1 emitem a 529 nm e os “J-agregados” a 590 nm. Os dados foram obtidos utilizando o software BD FACSDiva Um total de 10.000 eventos foram coletados para cada amostra e analisados com auxílio do programa WinMDI 2.9.

4.8.3 Iodeto de Propídio (IP)

A detecção da apoptose de macrófagos foi realizada utilizando a marcação com Iodeto de Propídio. O IP é impermeável à membrana plasmática íntegra, assim as células negativas

para a marcação com IP estão viáveis. Já nas células mortas o IP tem acesso ao DNA celular devido à perda da integridade das membranas plasmática e nuclear destas células

Macrófagos foram cultivados em placas de cultura de 12 poços e submetidos ao tratamento por 1 hora com o extrato nas concentrações de 50 e 100 µg/mL. Após o tratamento, as células foram raspadas, centrifugadas, lavadas com PBS e novamente centrifugadas. Em seguida, as células foram marcadas com 10 µL de IP por 30 minutos. Por fim, foram submetidas a lavagens com PBS e a leitura feita em citômetro de fluxo. Um total de 10.000 eventos foram coletados para cada amostra e analisados conforme descrito no item 4.8.2. Células marcadas pelo IP foram consideradas mortas.

4.9 ANÁLISE MORFOLÓGICA DA CÉLULA HOSPEDEIRA TRATADA COM O EXTRATO

4.9.1 Microscopia óptica

Macrófagos foram cultivados como descrito no item 4.4 e tratados por 1 hora com 50 e 100 µg/mL do extrato e, posteriormente, fixados com uma solução de tampão PHEM e 4% de paraformol durante 30 minutos. A coloração foi feita com o corante Giemsa, diluído a 10 % em água destilada, durante 30 minutos à temperatura ambiente. Após esse período, as células foram desidratadas em acetona 100% e passadas em misturas crescentes de acetona-xilol, até duas passagens finais em xilol puro. As lamínulas foram, então, montadas em lâminas de vidro, tendo *Entellan*® como meio de montagem. As células foram analisadas em microscópio óptico Olympus Bx53 câmera Olympus DP72.

4.9.2 Microscopia Óptica de Fluorescência - detecção de filamentos de actina e microtúbulos

Macrófagos foram cultivados como descrito no item 4.4 e tratados por 24h com a concentração de 50 e 100 µg/mL do extrato. As células foram fixadas em paraformaldeído 4% em tampão PHEM 0,1 M por 1 hora. Em seguida foram permeabilizadas em 0,3% Triton-X, lavadas em PBS e os sítios de ligação foram bloqueados com solução de NH₄Cl 50mM. Após o bloqueio, foram realizadas lavagens com PBS suplementado com 1 e 3% de BSA.

Para detecção de filamentos de actina, as células foram incubadas com fluorocromo Faloidina (Molecular Probes Invitrogen®) diluído 1:200 em PBS com 1% de

BSA durante 40 minutos, seguido de lavagem em PBS 3% BSA e PBS 1% BSA. Ou incubadas com anticorpo primário anti-tubulina (Molecular Probes Invitrogen®) diluído 1:100 em PBS 1% durante 1 hora, para detecção de microtúbulo. Em seguida foram incubados com anticorpo secundário Alexa-Fluor, 488 (Molecular Probes Invitrogen®) para revelar a reação. As células também foram incubadas com DAPI diluído 1:10 em PBS por 40 minutos para marcação do núcleo, sendo por fim lavadas em PBS e água.

As lamínulas foram montadas em lâmina contendo o *ProLong Gold antifade reagent* (Molecular Probes Invitrogen®). As células marcadas com Faloidina foram analisadas em filtro de 594 nm e as marcadas para microtúbulos foram analisadas em filtro de 488 nm. Foram observadas e fotografadas em Microscópio Confocal Pascal LSM-510 (Zeiss).

4.9.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Macrófagos foram cultivados e tratados em placas de cultura contendo lamínulas de vidro como no item 4.4 e processados para MEV como descrito no item 4.7.2. As células foram analisadas no microscópio eletrônico de varredura Quanta 250, marca FEI Company (Laboratório de Ultraestrutura Celular “Hertha Meyer” do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho – UFRJ). Como controles foram utilizados macrófagos sem tratamento.

4.9.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Macrófagos foram cultivados em garrafas de cultura como descrito no item 4.4 e tratados por 1 hora na concentração de 50 e 100 µg/mL e foram processados e analisados como descrito no item 4.7.3.

4.10 PRODUÇÃO DE RADICAIS SUPERÓXIDOS EM MACRÓFAGOS INFECTADOS E TRATADOS COM O EXTRATO

4.10.1 Detecção de radicais superóxidos em macrófagos tratados com o extrato.

Macrófagos (5×10^5 células por poço) foram cultivados em placa de cultura como descrito no item 4.4. As células foram lavadas com PBS e incubadas com meio contendo 0,5 mg/ml de Nitroblue Tetrazolium (NBT) e as concentrações de 50 e 100 µg/mL do extrato.

Como controle positivo foi utilizado *Saccharomyces cerevisiae*. Após 1 h a 37°C e em atmosfera de 5% de CO₂, as células foram lavadas com PBS pH 7.2 e fixadas em paraformaldeído 4% por 30 minutos, desidratadas e montadas como descrito no item 4.5.2 e posteriormente, analisadas em microscópio óptico Axiophot.

4.10.2 Detecção de radicais superóxidos em macrófagos infectados e tratados com o extrato.

Macrófagos (5×10^5 células por poço) foram cultivados em placa de cultura de 24 poços como descrito no item 4.4. As células foram lavadas com PBS e incubadas com meio contendo 0,5 mg/ml de Nitroblue Tetrazolium (NBT), 1:10 parasitos e as concentrações de 50 e 100 µg/mL do extrato. Como controle positivo foi utilizado *Saccharomyces cerevisiae*. Após 1 h a 37 °C e em atmosfera de 5% de CO₂, as células foram lavadas com PBS pH 7.2 e fixadas em paraformaldeído 4% por 30 minutos, desidratadas e montadas como descrito no item 4.5.2.

4.12 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos foram analisados utilizando o Graph Pad Prism Versão 5.0. O teste usado foi a análise de variância, ANOVA, e Teste t de Student, com (*) $p < 0,05$, (**) $p < 0,01$, (***) $p < 0,001$.

5. RESULTADOS

5.1 IDENTIFICAÇÃO DOS COMPONENTES DO EXTRATO POR ESPECTROMETRIA DE MASSA

O extrato aquoso de *P. angulata* foi analisado por HRESITOF para identificar os possíveis princípios ativos presentes. Foram observados diferentes picos na coluna de cromatografia líquida. Dentre eles, foram identificadas as Fisalinas D, E, F e G (Tabela 1).

Tabela 1. Análise dos componentes do extrato de Pa por espectrometria de massa de alta resolução por micrTOF II - ESI-TOF

<i>t</i>R (min)	Componente	m/z [M-H]⁻	Fórmula Molecular
5.4	Fisalina D	545.20323	C ₂₈ H ₃₁ O ₁₁
4.4	Fisalina G	544.19447	C ₂₈ H ₃₀ O ₁₀
2.5	Fisalina E	545.20427	C ₂₈ H ₃₂ O ₁₁
16.5	Fisalina F	527.19243	C ₂₈ H ₃₀ O ₁₀

*t*R: tempo de retenção

5.2 ATIVIDADE LEISHMANICIDA

5.2.1 Atividade antipromastigota

O efeito do extrato aquoso da planta *Physalis angulata* (Pa) sobre promastigotas de *L. (L.) amazonensis* foi monitorado durante 96 horas consecutivas. Na figura 11 A e B pode-se observar que as culturas de *L. amazonensis* foram mais sensíveis ao tratamento com o extrato de Pa do que com a Glucantime®. Foi observada uma redução de 25% e 22,4% no número de parasitas viáveis tratados com 50 e 100 µg/mL de Glucantime, respectivamente (Figura 11A). Em contraste, o extrato induziu uma redução dose-dependente na proliferação dos parasitos de 74,5% e 99,8% nas concentrações de 50 e 100 µg/mL, respectivamente, representando um IC₅₀ de 35.5 µg/mL (Figura 11B).

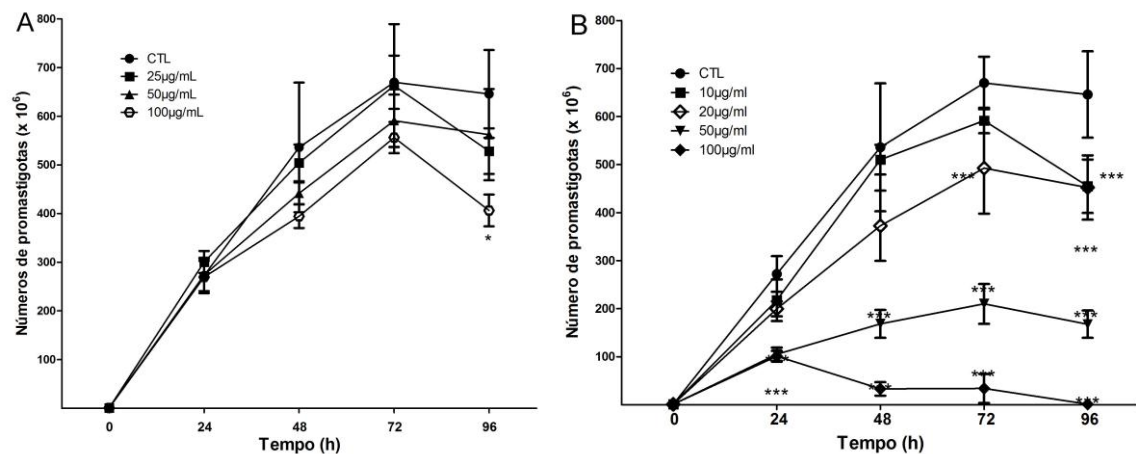


Figura 11. Curva de crescimento de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* tratadas com diferentes concentrações de Glucantime (A) e de Pa (B) durante 96h. * $p < 0.05$, *** $p < 0.001$ representa a diferença entre células tratadas e o controle sem tratamento. CTL: Controle

5.2.2 Atividade anti-amastigota

A atividade leishmanicida do extrato de Pa também foi avaliada em macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* e tratados diariamente por 1 h durante 3 dias. Na Figura 12 é possível observar uma diminuição significativa no número de amastigotas no interior da célula hospedeira, quando comparado ao controle sem tratamento. A redução dos parasitas foi observada em todas as concentrações testadas. Entretanto, os resultados mais significativos foram encontrados nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ do extrato, foi detectada uma redução no crescimento de amastigotas de 70,6% e 70,9%, respectivamente (IC_{50} 32,0 $\mu\text{g/mL}$).

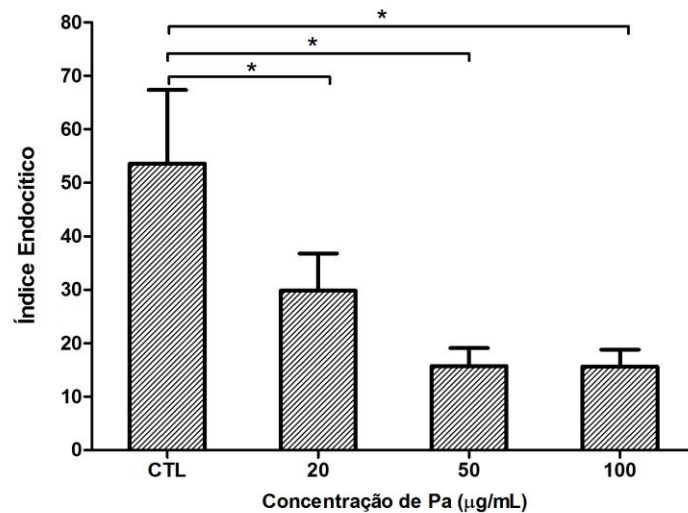


Figura 12. Efeito do extrato de Pa sobre amastigotas *L. (L.) amazonensis*. Macrófagos infectados foram tratados com diferentes concentrações do extrato, por 1 hora, durante três dias consecutivos. (*) $p < 0,001$ representa a diferença entre células tratadas e o controle sem tratamento.

5.3 EXTERNALIZAÇÃO DE FOSFATIDILSERINA E REDUÇÃO DO VOLUME CELULAR EM PROMASTIGOTAS APÓS TRATAMENTO COM O EXTRATO.

Para investigar se indução de morte celular em promastigotas tratadas com o extrato de Pa era causada por apoptose, foi utilizado o teste de dupla marcação com anexina V e IP. Os resultados obtidos demonstraram que a exposição de FS aumentou durante o tratamento com o extrato de Pa. Foi observado um aumento significativo de promastigotas marcadas positivamente para anexina V de 20,32% quando tratadas com 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 52,79% tratadas com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de Pa por 72 h, em comparação com 4,59% de células não tratadas (Figura 13), respectivamente. Já a análise do histograma (Figura 14) que corresponde ao volume celular de promastigotas não tratadas foi observada dois tipos de populações representadas por dois picos, o primeiro (a esquerda) apresentaram promastigotas com tamanho menor (ponta de seta) e o último pico (a direita) demonstrou promastigotas com tamanho maior (seta). Quando promastigotas foram tratadas com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do extrato foi observada uma diminuição da população com tamanho celular maior, e um aumento da população de células com tamanho menor (Figura 14).

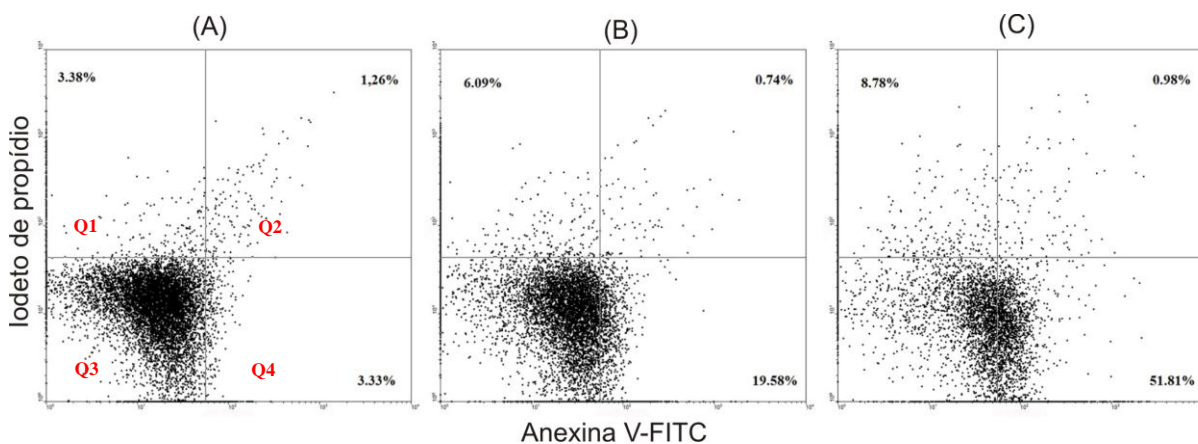


Figura 13. Exposição de fosfatidilserina em formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com o extrato de *P. angulata* por 72 h utilizando anexina-V e IP. (A) Promastigotas não tratadas. (B) Promastigotas tratadas com 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do extrato de Pa. (C) Promastigotas tratadas com 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ do extrato de Pa. Quadrante-Q3 (anexina V-488-/IP-) indica o controle.

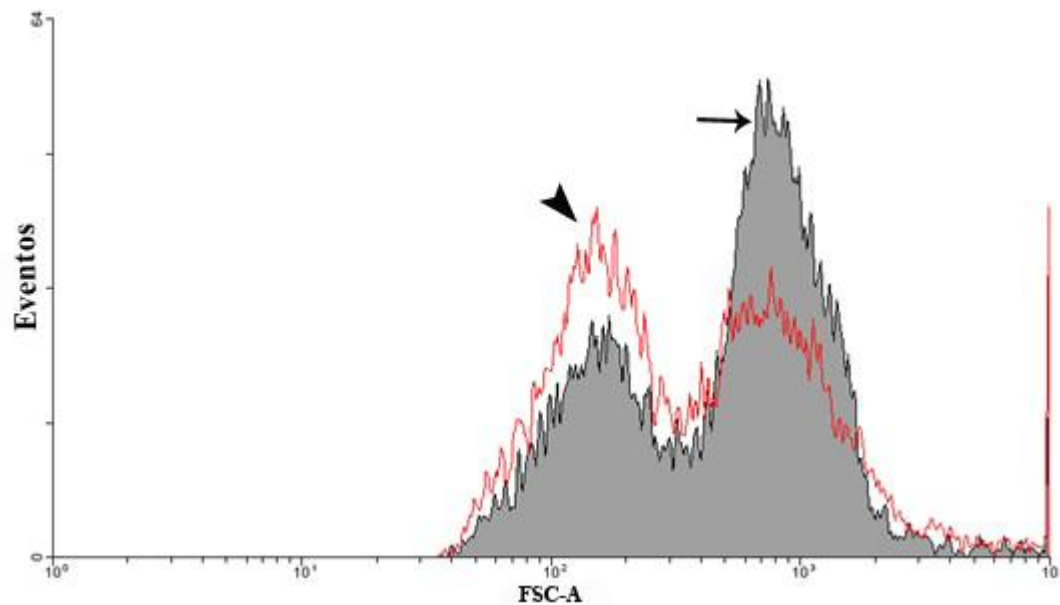


Figura 14: Volume celular de formas promastigotas de *L. amazonensis* tratadas com 100µg/mL do extrato de Pa por 72 h. FSC-A foi utilizado como parâmetro para o tamanho celular. A área cinza corresponde ao controle (parasitas não tratados) e linha vermelha corresponde aos parasitas tratados com 100µg/mL do extrato.

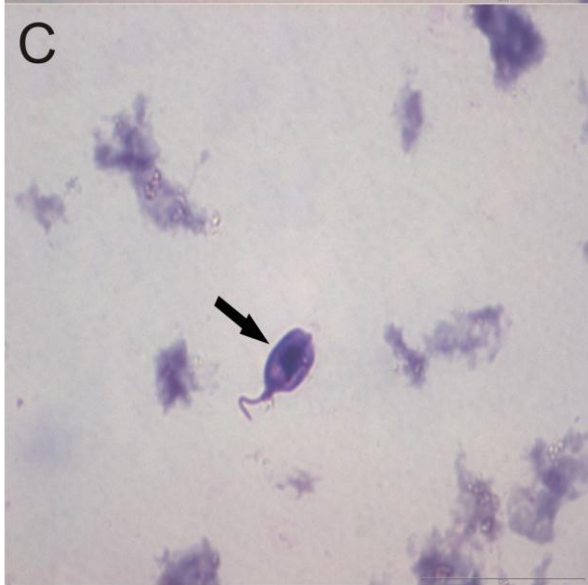
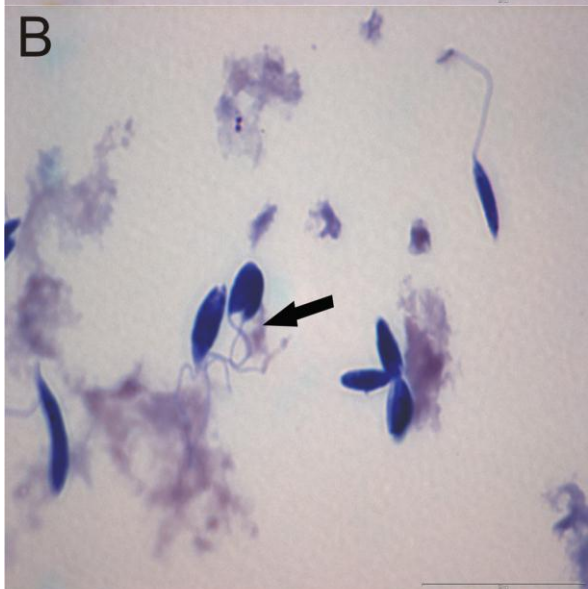
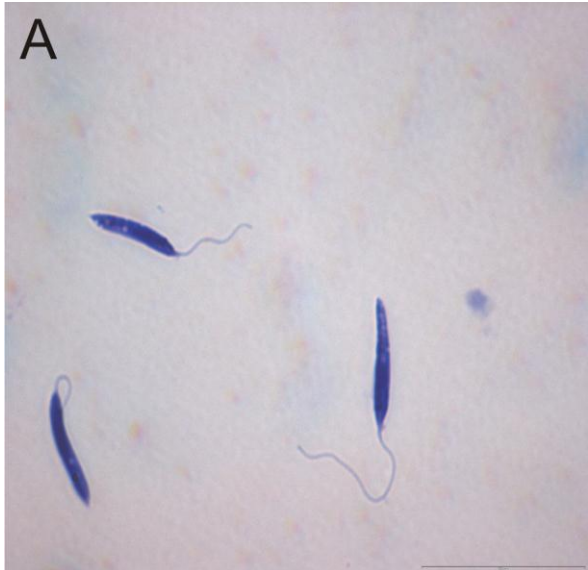
5.4 ALTERAÇÕES MORFOLÓGICAS DE PROMASTIGOTAS TRATADAS COM O EXTRATO

5.4.1 Microscopia óptica

Foram observadas inúmeras alterações morfológicas das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, após o tratamento com o extrato aquoso de *P. angulata*. Promastigotas sem tratamento apresentaram morfologia típica, com corpo alongado e a presença de um único flagelo (Figura 15-A).

Em contraste, promastigotas tratadas com 50 µg/mL do extrato, apresentaram formas arredondadas, com duplo flagelo e redução do tamanho celular (Figura 15-B). Nas promastigotas tratadas com 100 µg/mL do extrato foi observada uma redução no número de células e presença de muitos fragmentos celulares. Os protozoários apresentaram volume celular bastante reduzido com corpo arredondado (Figura 15-C).

Figura 15. Alterações morfológicas das formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas com o extrato aquoso de Pa por 72h e corados com Giemsa. (A) Promastigotas apresentando morfologia típica como corpo alongado e um único flagelo. (B) Promastigotas tratadas com 50 µg/mL do extrato. Observar duplicação do flagelo (seta) e redução do volume celular. (C) Promastigotas tratadas com 100 µg/mL. Notar redução do tamanho da célula e corpo celular arredondado (seta). Barra: 20 µm.

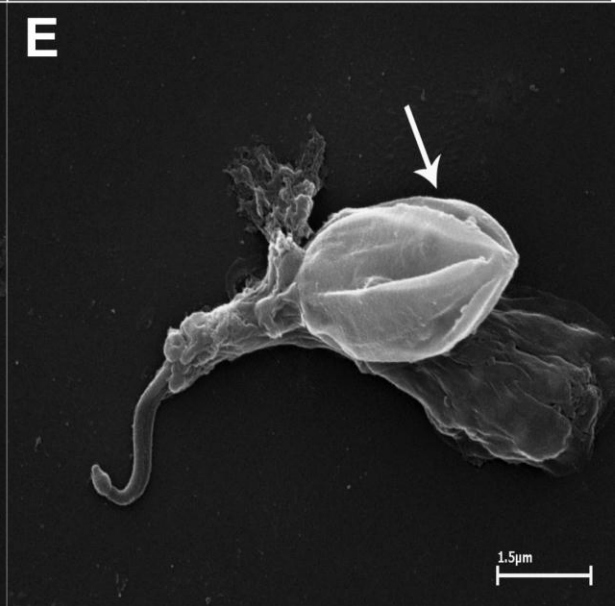
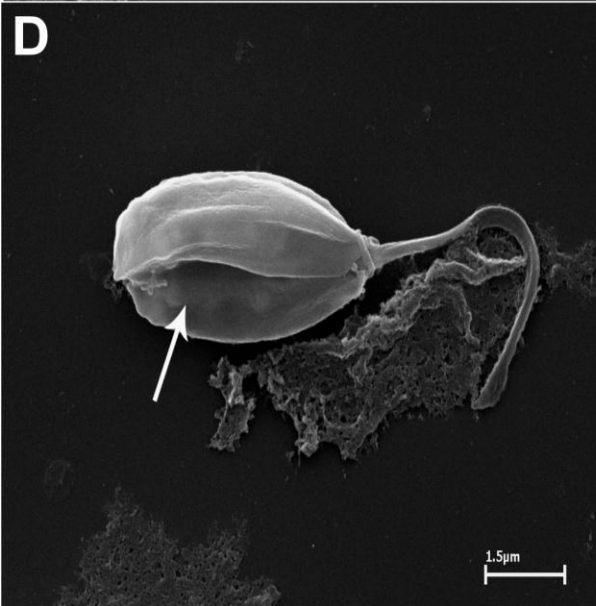
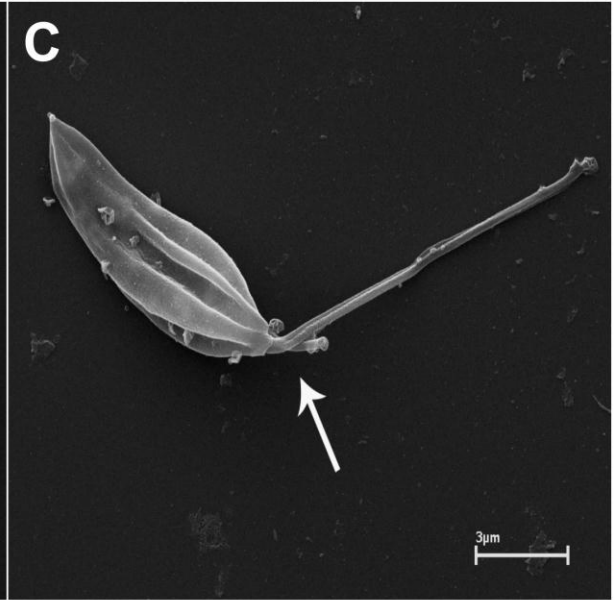
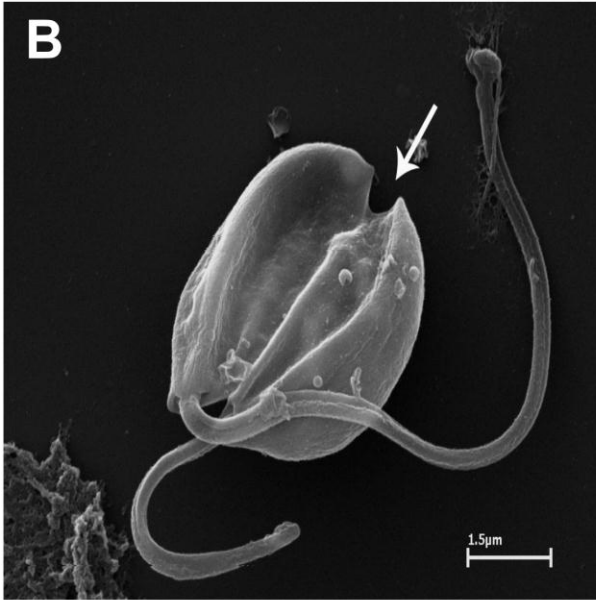
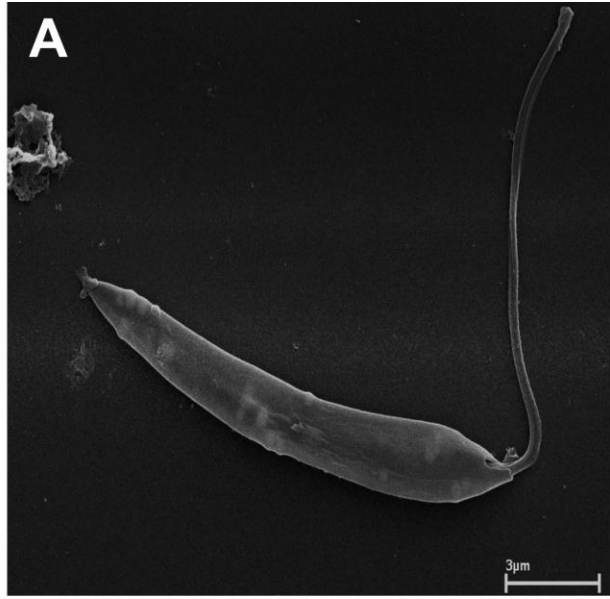


5.4.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

A microscopia eletrônica de varredura (MEV) permitiu confirmar com mais detalhes as alterações do flagelo e do corpo celular do parasita observada pela microscopia óptica. Nas formas promastigotas tratadas com 50 µg/mL de Pa foi possível observar duplicação do flagelo e células em aparente processo de divisão celular atípico (Figura 16B-C). Outras alterações foram observadas em promastigotas tratadas com 100 µg/mL Pa como, multiseptação do corpo celular, corpo celular arredondado e flagelo curto com a presença de debris celulares (Figura 16D-E), quando comparadas às promastigotas não tratadas (Figura 16A).

Figura 16. Alterações morfológicas em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* tratadas com extrato aquoso de *P. angulata* e observadas através de MEV.

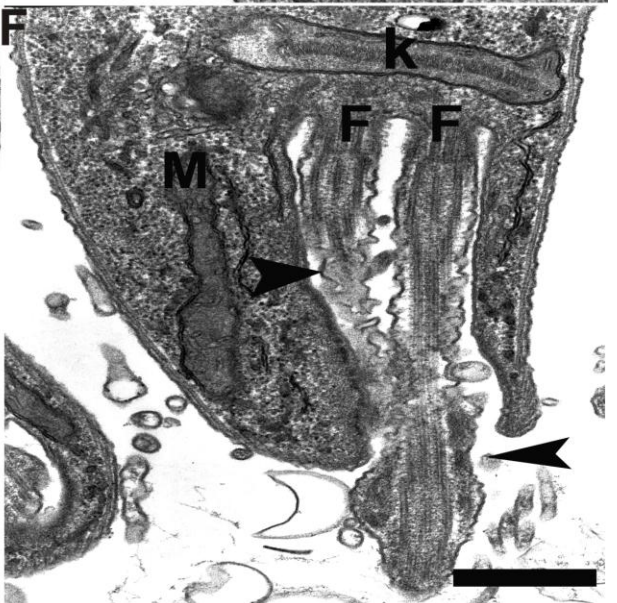
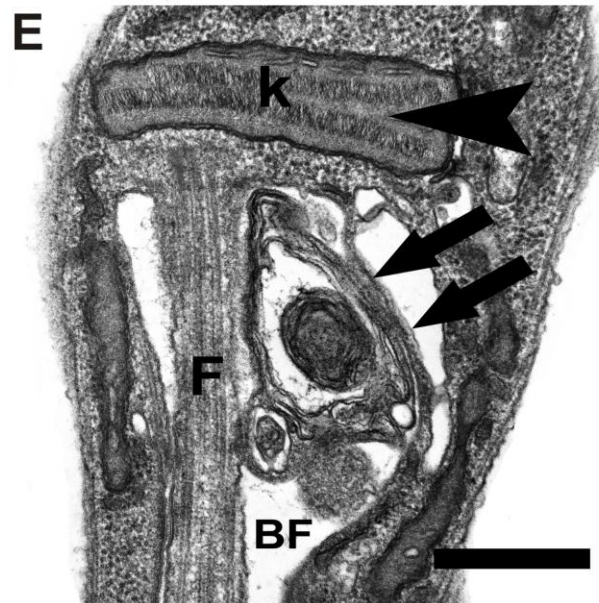
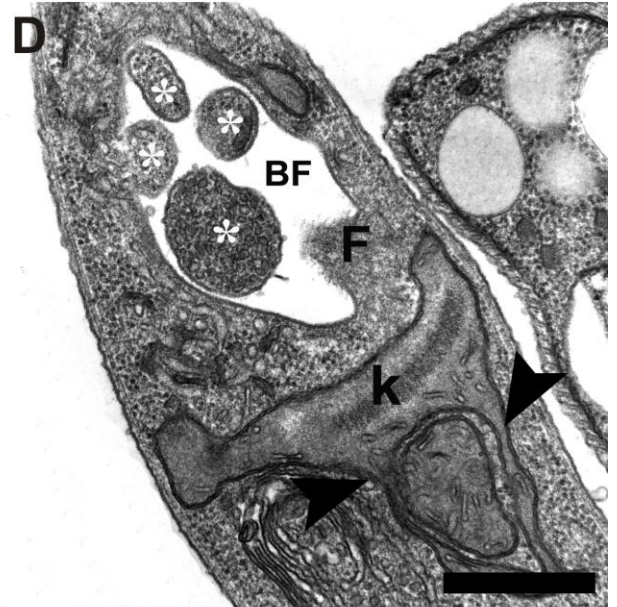
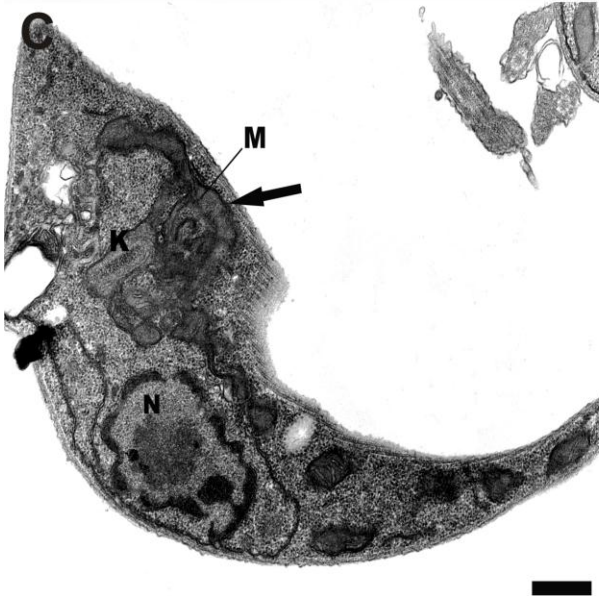
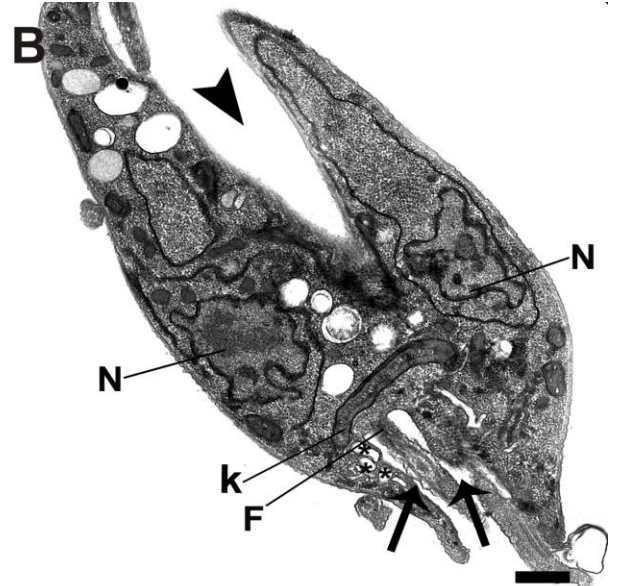
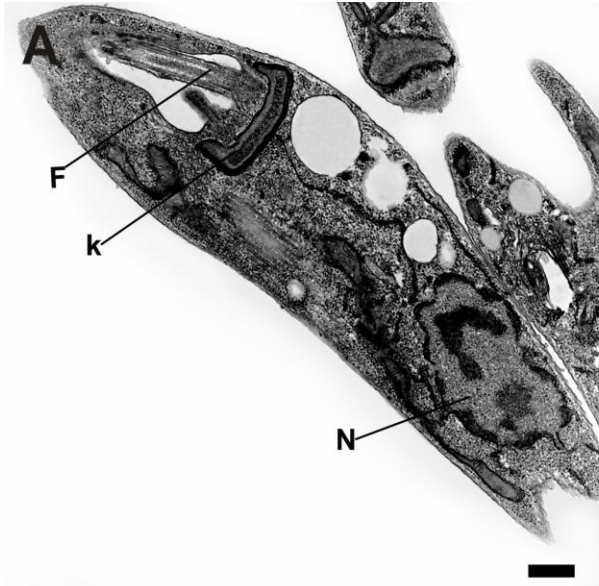
(A) Promastigotas sem tratamento. (B) Promastigotas tratadas com 50 $\mu\text{g/mL}$ do extrato. Observar célula em processo de divisão celular atípico (seta). (C) Observar duplo flagelo com tamanhos diferentes e multiseptação do corpo celular. (D-E) Promastigotas tratadas com 100 $\mu\text{g/mL}$ do extrato. Observar promastigotas com corpo celular arredondado e flagelo curto. Notar presença de debris celulares ao redor do protozoário e multiseptação do corpo celular (D-E) (setas). Barras: (A-C) 3 μm ; (B-D-E) 1,5 μm .



5.4.3 Microscopia Eletrônica de transmissão (MET)

Através da microscopia eletrônica de transmissão foi possível avaliar as principais alterações do parasito após o tratamento com o extrato. Nas promastigotas tratadas com 50 µg/mL do extrato foi possível observar alterações na membrana flagelar e na membrana que envolve a bolsa flagelar do parasita, além de processo de divisão celular atípico (Figura 17B), semelhante ao que foi observado por MEV. Porém alterações mais evidentes foram observadas nas promastigotas tratadas com 100 µg/mL do extrato como, alterações na membrana do flagelo e na bolsa flagelar, como a presença de figuras semelhantes à mielina e presença de múltiplas vesículas no seu interior. Foi possível observar também alterações morfológicas no cinetoplasto como, duplicação irregular, aumento do tamanho e figuras semelhantes à mielina, esta foi a principal organela alterada (Figura 17C-F), quando comparada às promastigotas não tratadas (Figura 17A).

Figura 17. Alterações ultraestruturais de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* tratadas com o extrato aquoso de Pa. (A) Controle: Promastigotas sem tratamento. (B) Promastigotas tratadas com 50 µg/mL do extrato. Observar alterações na membrana flagelar e ruptura do flagelo (setas) e vacúolos na membrana da bolsa flagelar (*). Observa-se processo de divisão atípico (ponta de seta). (C-F) Promastigotas tratadas com 100 µg/mL do extrato. (C) Figuras semelhantes a mielina na mitocôndria e próximo ao cinetoplasto (seta). (D) Observar a presença de vesículas na bolsa flagelar (*) e cinetoplasto dilatado (ponta de seta). (E) Presença de figuras semelhantes à mielina na bolsa flagelar (setas largas) e duplicação irregular do cinetoplasto (ponta de seta). (F) Alterações na membrana flagelar do parasita. N – núcleo; BF – bolsa flagelar; K – cinetoplasto; F – flagelo; M – Mitocôndria. Barras: (A-C) 5 µm; (B-D-E-F) 2 µm.



5.5 DETECÇÃO DA VIABILIDADE DA CÉLULA HOSPEDEIRA TRATADA COM O EXTRATO

5.5.1 Método colorimétrico *Thiazolyl Blue* (MTT)

No presente estudo não houve diminuição significativa da viabilidade celular após tratamento por 1 h nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ do extrato e, posteriormente mantida por 24 h em cultivo. O teste mostrou também que até a concentração de 400 $\mu\text{g/mL}$ as células mostraram-se viáveis. Como controle negativo, as células foram fixadas com solução de 10% de formol em PBS (Figura 18).

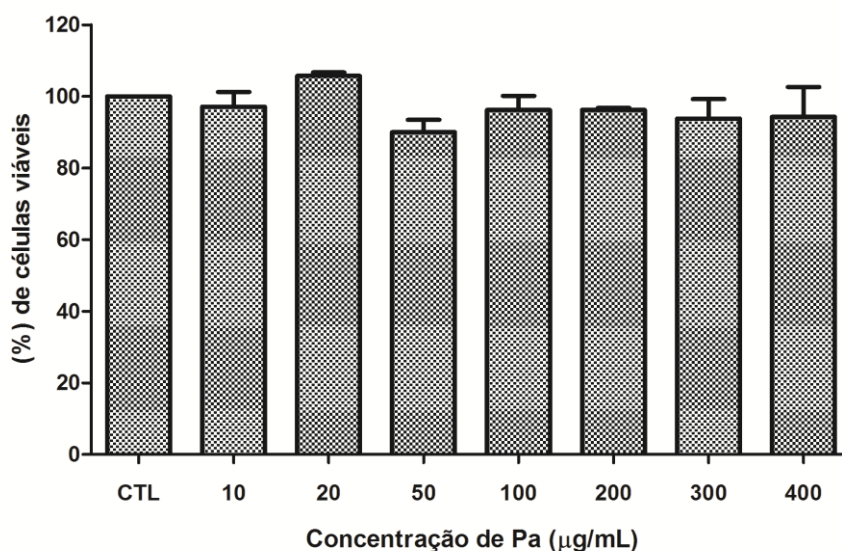


Figura 18. Viabilidade celular pelo método MTT em macrófagos tratados com o extrato de Pa durante 1 hora e mantidos em cultivo por 24 horas.

5.5.2 Detecção do Potencial de Membrana Mitocondrial (JC-1)

Este estudo também avaliou o Potencial de Membrana Mitocondrial através do método JC-1. Histogramas representativos de citometria de fluxo são observados na Figura 19. Este método mostrou que as células tratadas com 50 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 19B) e 100 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 19C) do extrato mantiveram-se viáveis com 94, 56% e 93, 45%, respectivamente, semelhantes ao controle sem tratamento 94, 61% (Figura 19A). Com base nos dados obtidos por citometria, os macrófagos tratados foram analisados por microscópio confocal (Figura 20) e foi possível observar que as células tratadas com 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ apresentaram o mesmo

padrão de fluorescência vermelha observadas no controle sem tratamento. Isso indica que o extrato de Pa não possui efeito citotóxico para a célula hospedeira. Esse resultado complementa aqueles obtidos pela citometria de fluxo e pelo método colorimétrico MTT.

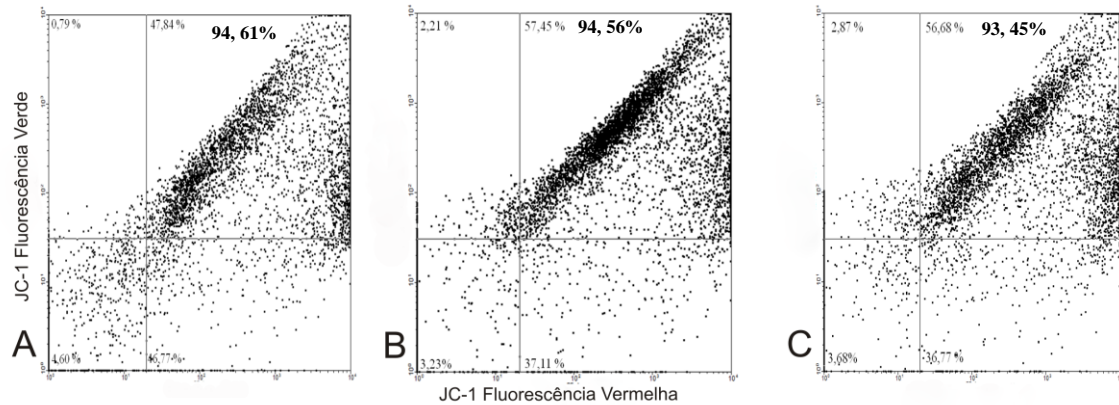


Figura 19. Análise por citometria de fluxo da viabilidade celular pelo método JC-1 em macrófagos tratados com o extrato de Pa durante 1 hora. (A) Controle sem tratamento. (B-C) Macrófagos tratados com 50 e 100 µg/mL de Pa, respectivamente

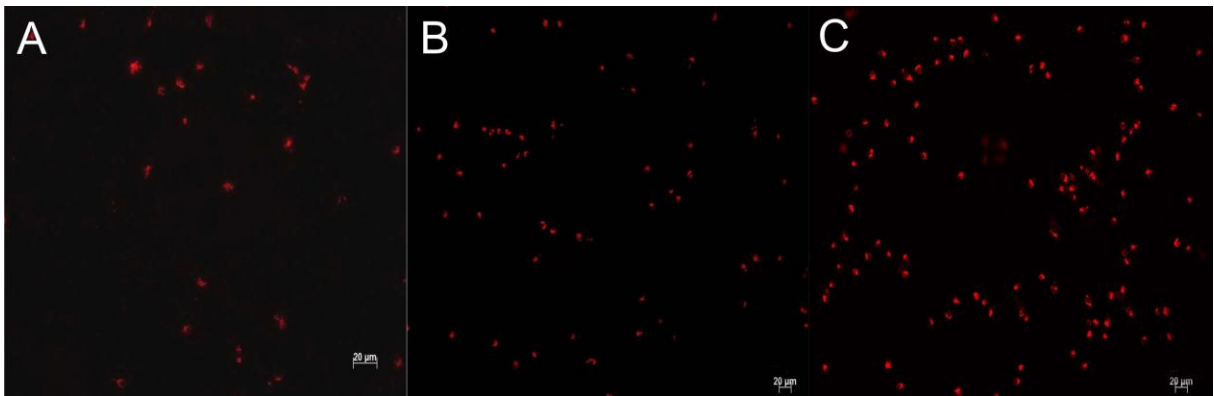


Figura 20. Análise por Microscopia de fluorescência da viabilidade celular pelo método JC-1 em macrófagos tratados com o extrato de Pa por 1 hora.

(A) Controle sem tratamento. Observar fluorescência vermelha indicando viabilidade das mitocôndrias. Macrófagos tratados com 50 µg/mL (B) e 100 µg/mL (C) do extrato, respectivamente. Observar padrão de fluorescência vermelha, semelhante às células não tratadas. Barra (A-C) 20 µm.

5.5.3 Iodeto de Propídio (IP)

Para análise de morte celular foi utilizado o IP, onde apenas as células mortas são capazes de reter o corante. Não foi observado aumento no número de células mortas tratadas com o extrato de Pa (Figura 21B-C) quando comparadas com o controle sem tratamento (Figura 21A).

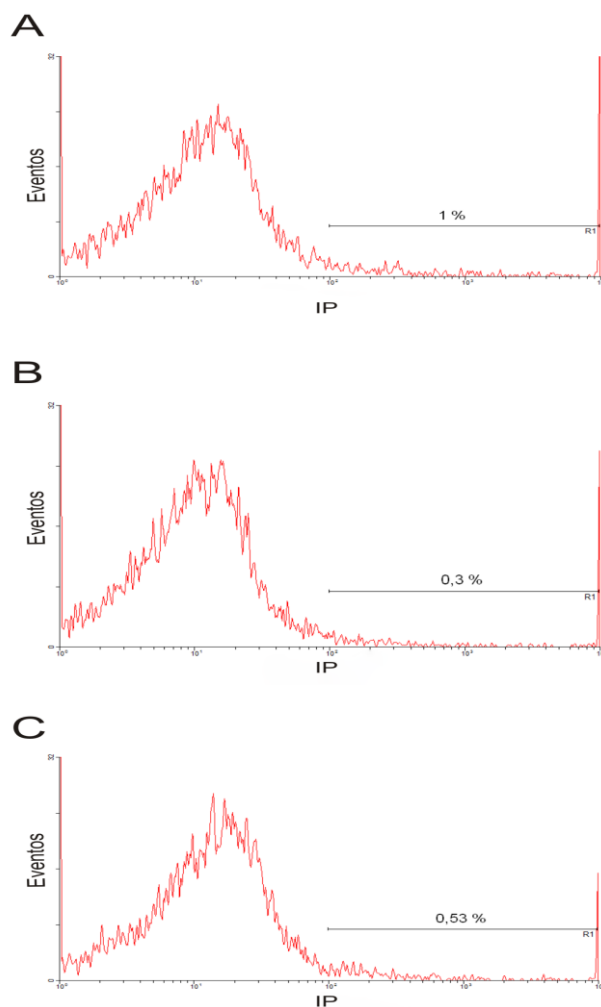


Figura 21. Ensaio de apoptose por citometria de fluxo utilizando Iodeto de Propídio como marcador em macrófagos tratados com extrato de Pa.

(A) Controle: macrófagos sem tratamento. (B-C) Macrófagos tratados com 50 e 100 µg/mL do extrato de Pa, respectivamente. Os números nos gráficos indicam as porcentagens de células marcadas com IP.

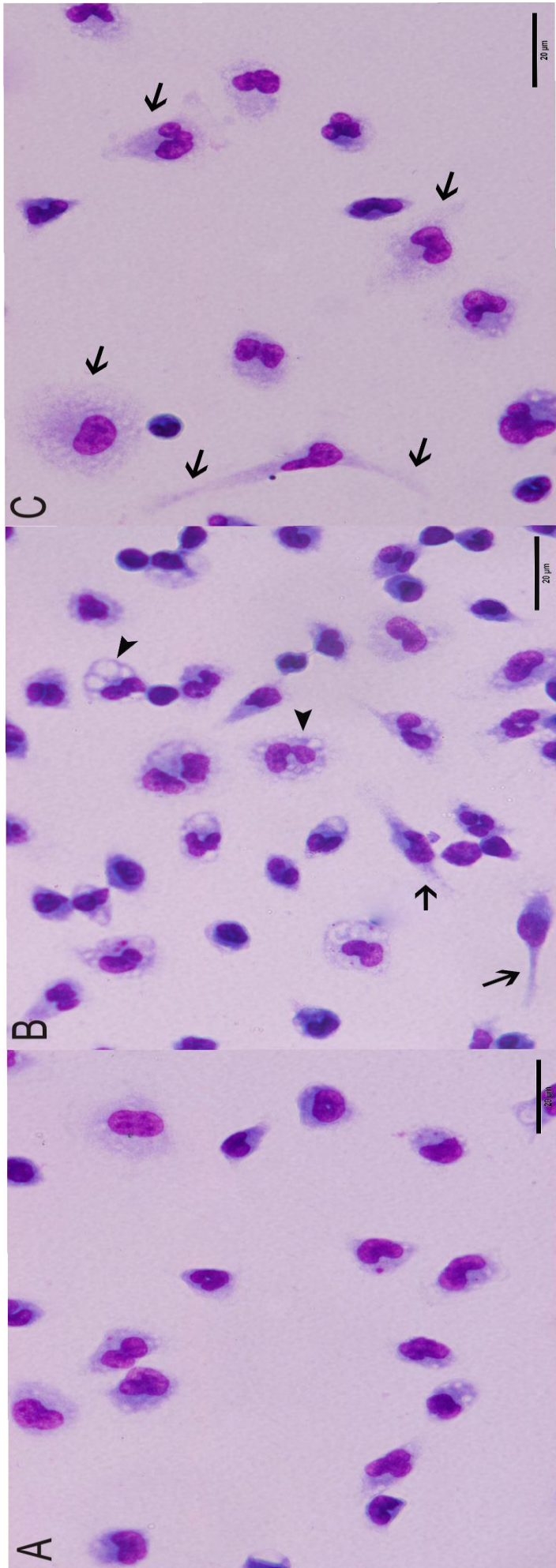
5.6 ANÁLISE MORFOLÓGIA DA CÉLULA HOSPEDEIRA

5.6.1 Microscopia Óptica

Por meio da microscopia óptica de campo claro foi observado um aumento no espraiamento e maior número de filopódios e vacúolos nas células tratadas por 1 hora com o extrato de Pa nas concentrações de 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 22 B-C) quando comparadas ao controle sem tratamento (Figura 22A).

Figura 22. Análise morfológica de macrófagos tratados com extrato de Pa por 1 hora e corados com Giemsa.

(A) Controle sem tratamento. Observar aspecto geral de macrófagos residentes. (B) Macrófagos tratados com 50 $\mu\text{g/mL}$. Observar o espraiamento celular (setas) e presença de vacúolos nas células tratadas (ponta de seta). (C) Macrófagos tratados com 100 $\mu\text{g/mL}$. Notar aumento do espraiamento celular e volume celular (setas). Barra (A-C) 20 μm .

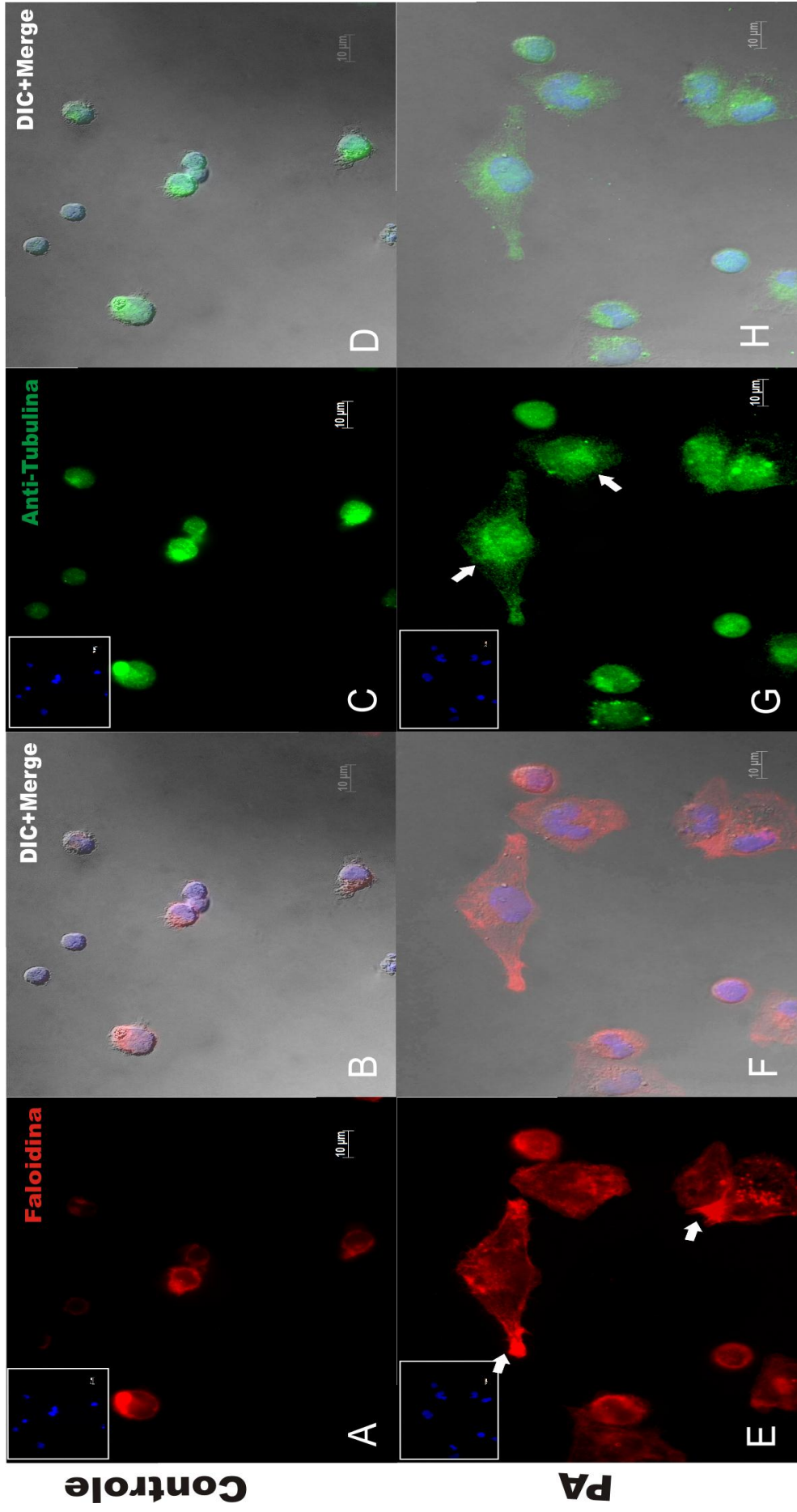


5.6.2 Microscopia Óptica de Fluorescência

Observadas as alterações por microscopia óptica os componentes do citoesqueleto de macrófagos foram analisados por microscopia de fluorescência após o tratamento com o extrato por 1h (Figura 23). Células não tratadas apresentaram características semelhantes a macrófagos residentes para filamentos de actina e microtúbulos (Figura 23 A-D). Macrófagos tratados com 100 µg/mL demonstraram alterações na distribuição de filamentos de actina, com formação de filopódios e uma concentração de actina nessas regiões (Figura 23 E-F) (setas brancas). A marcação para microtúbulo demonstrou a polimerização deste componente, principalmente próximo à membrana nuclear com extensão por todo o corpo celular (Figura 23 G-H) (setas brancas). O DAPI foi utilizado para identificação e análise de possíveis alterações nucleares (inset) e não foi detectada nenhuma alteração no núcleo das células tratadas.

Figura 23. Detecção de componentes do citoesqueleto em macrófagos tratados com 100 µg/mL do extrato de Pa.

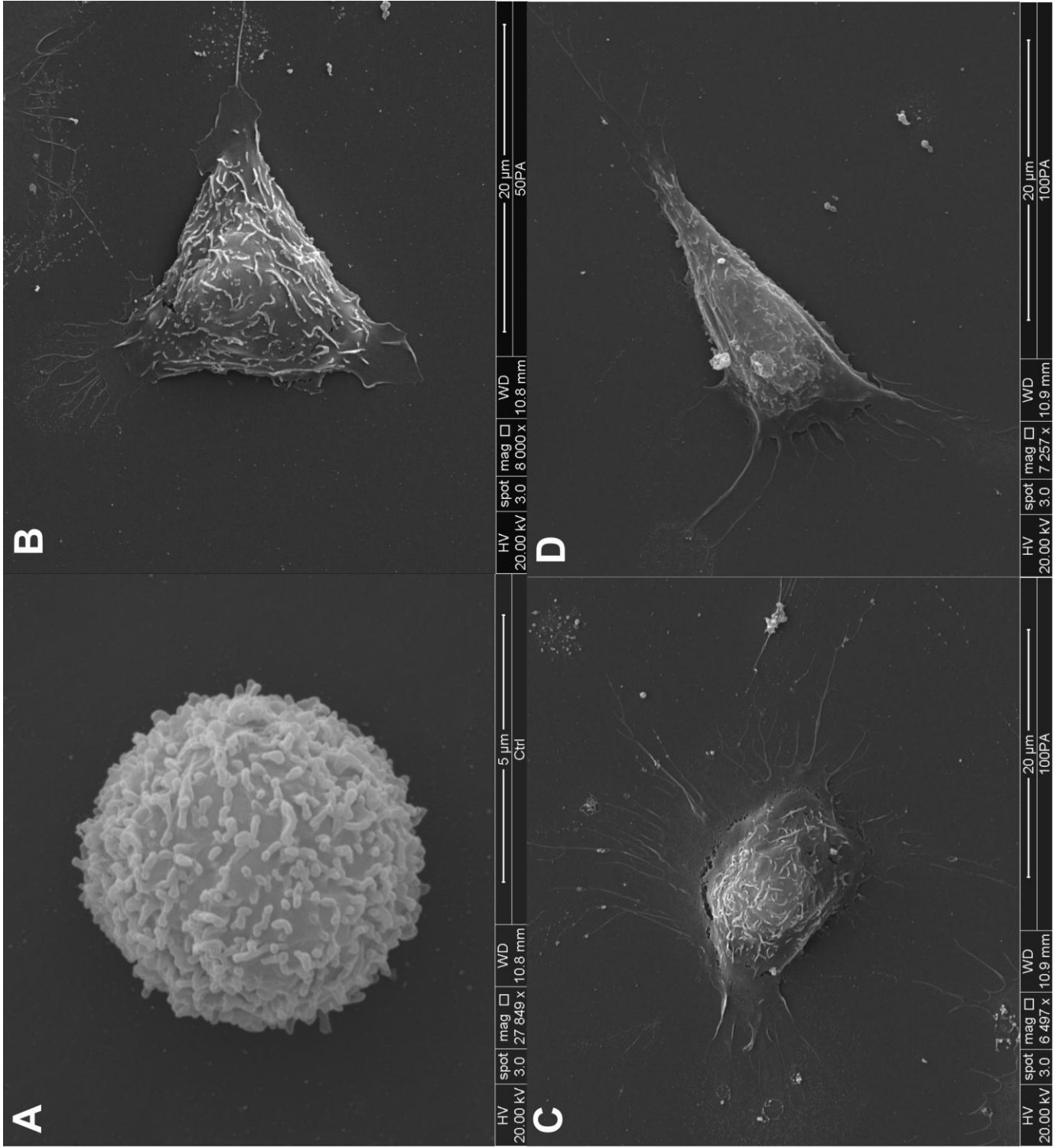
(A-D) Macrófagos não tratados. Observar marcação de filamentos de actina com Faloidina e microtúbulos (E-F) Macrófagos tratados com extrato demonstrando a formação de filopódios (setas brancas) e (G-H) células tratadas demonstrando a polimerização de microtúbulos se estendendo do núcleo até a membrana celular. *Inset:* DAPI. (B-D) e (F-H) Contraste interferencial de Normaski. Barra: 20µm.



5.6.3 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

Devido às alterações e espraiamento observadas em MO foi realizada a MEV para uma análise mais detalhada a respeito das alterações morfológicas e confirmação dos dados. Nos macrófagos tratados com 50 e 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ foi possível observar a presença de muitos filopódios e maior espraiamento e adesão nas células tratadas (Figura 24B-D) quando comparadas às células não tratadas (Figura 24A).

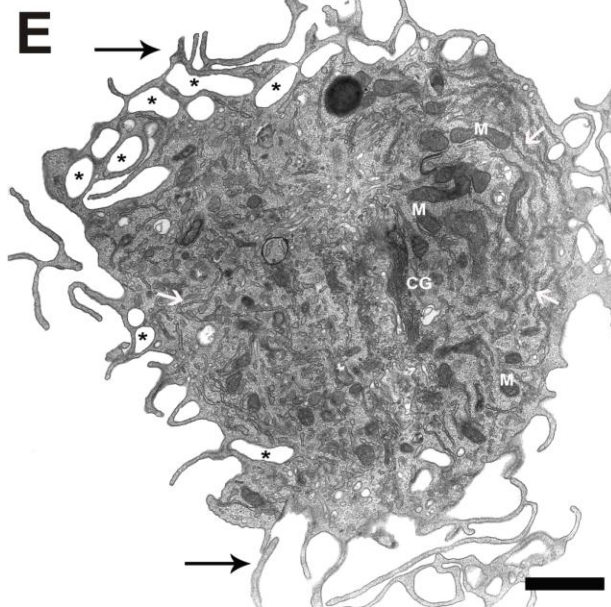
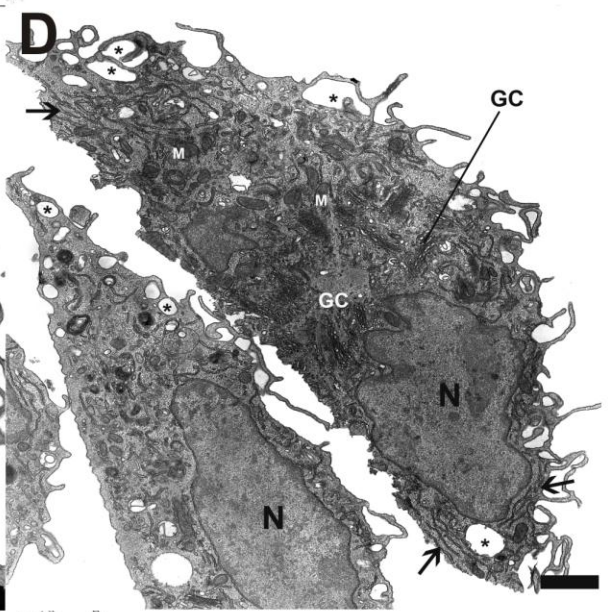
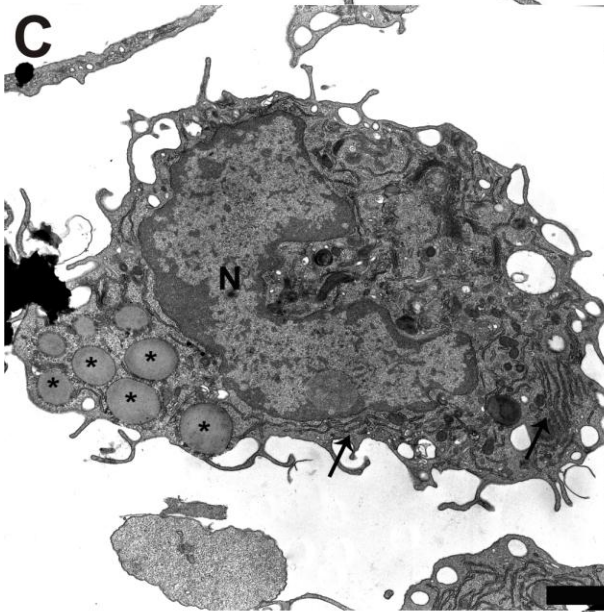
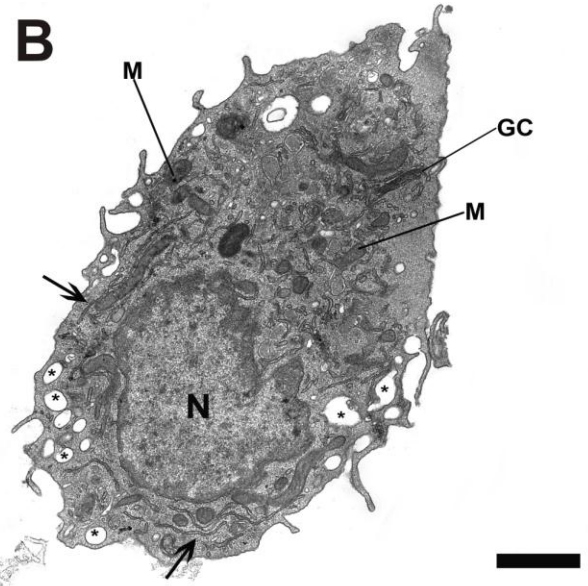
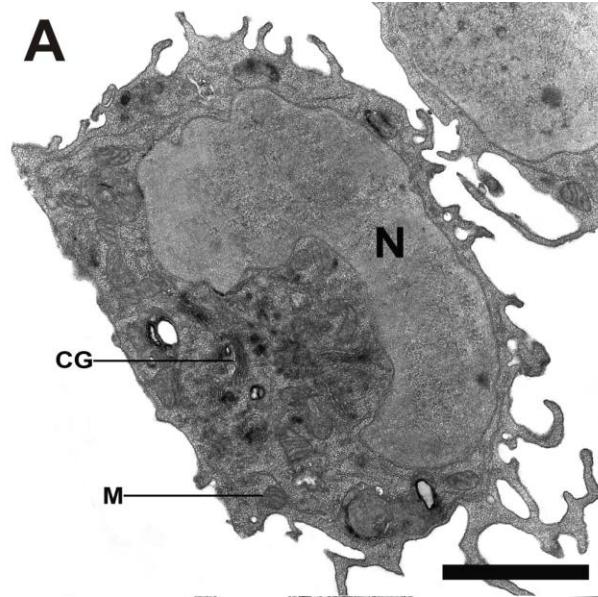
Figura 24. Microscopia eletrônica de Varredura de Macrófagos tratados com 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ Pa. (A) Macrófagos residentes sem tratamento. Observar formato arredondado da célula e ausência de projeções citoplasmáticas. (B) Células tratadas com 50 $\mu\text{g/mL}$. (C-D) Macrófagos tratados com 100 $\mu\text{g/mL}$. Observar células com alteração no tamanho e forma, além da presença de várias projeções citoplasmáticas e maior espreadimento celular quando comparadas às células não tratadas. Barras: (A) 5 μm ; (B-D) 20 μm .



5.6.4 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

Para observar as alterações ultraestruturais com maiores detalhes, macrófagos tratados com 50 e 100 $\mu\text{g/mL}$ do extrato foram analisados por MET. Foi observado a presença de inúmeros filopódios e vacúolos (*) em células tratadas (Figura 25B-D-E). Não houve alterações nas organelas citoplasmáticas, como mitocôndria e no núcleo (Figura 25 B-E) da célula tratada quando comparadas às células não tratadas (Figura 25A). Os macrófagos tratados com as duas concentrações do extrato apresentaram aparente aumento de complexo de Golgi e RE (seta menor preta e branca) (Figura 25B-E) e estruturas sugestivas de vesículas lipídicas (*) (Figura 25C).

Figura 25. Análise ultraestrutural de macrófagos tratados com o extrato de Pa por 1h. (A) Controle. Observar ausência de vacúolos, poucos filopódios e organelas citoplasmáticas com características típicas de macrófagos residentes. (B-C) Macrófagos tratados com 50 µg/mL do extrato. Observar presença de vacúolos (*) e filopódios, além da presença de mitocôndrias sem alterações e retículo endoplasmático proeminente (setas). (D-E) Macrófagos tratados com 100 µg/mL do extrato. Observar espraiamento celular e muitos filopódios, núcleo e mitocôndrias apresentando morfologia típica. N: Núcleo, CG :Complexo de Golgi, M: Mitocôndria. Barras: (A-E) 5 µm.



5.8 PRODUÇÃO DE RADICAIS SUPERÓXIDOS POR MACRÓFAGOS INFECTADOS E TRATADOS COM O EXTRATO

5.8.1 Produção de superóxidos por macrófagos tratados com o extrato.

A produção dos radicais superóxidos foi observada em macrófagos tratados com Pa utilizando o NBT. As células tratadas com 100 µg/ml apresentaram intensa atividade da enzima por toda a célula. A partir da contagem de células foi possível confirmar a porcentagem de macrófagos que apresentaram reação positiva (Figura 26). Foram utilizados um controle negativo, macrófagos sem tratamento e um controle positivo (inset) para comprovar a especificidade do teste.

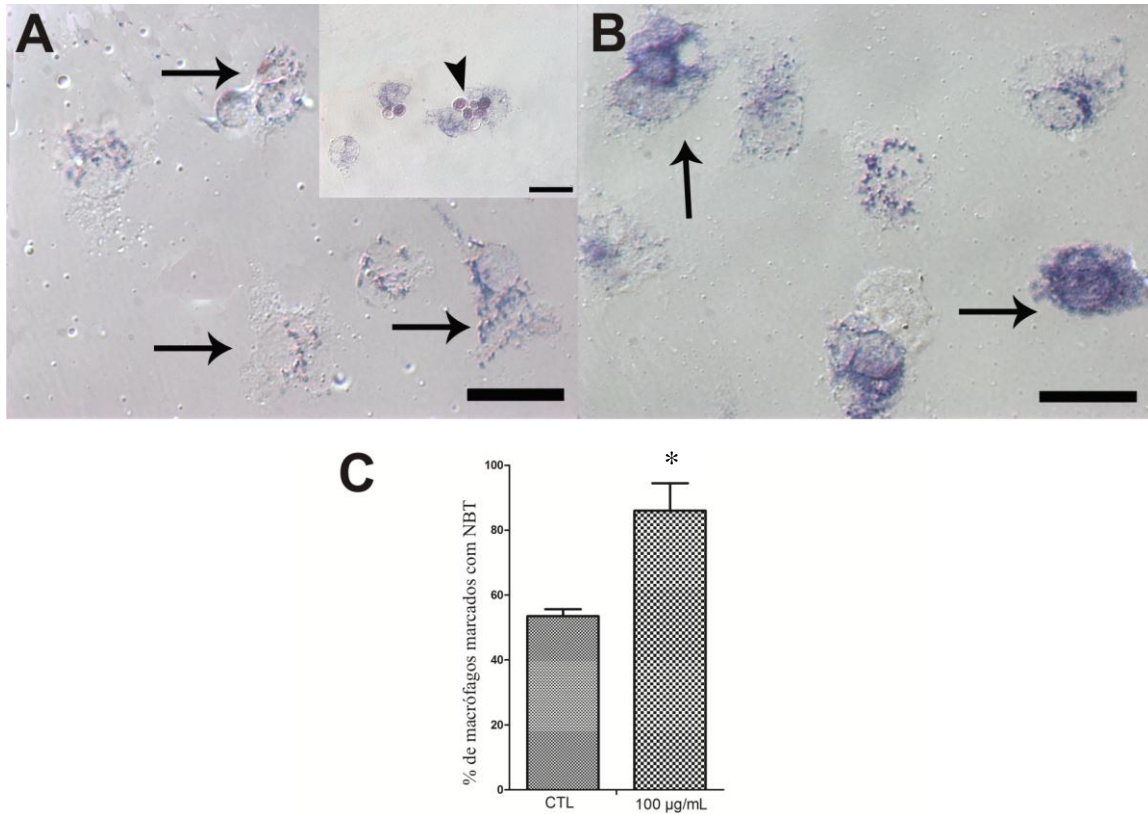
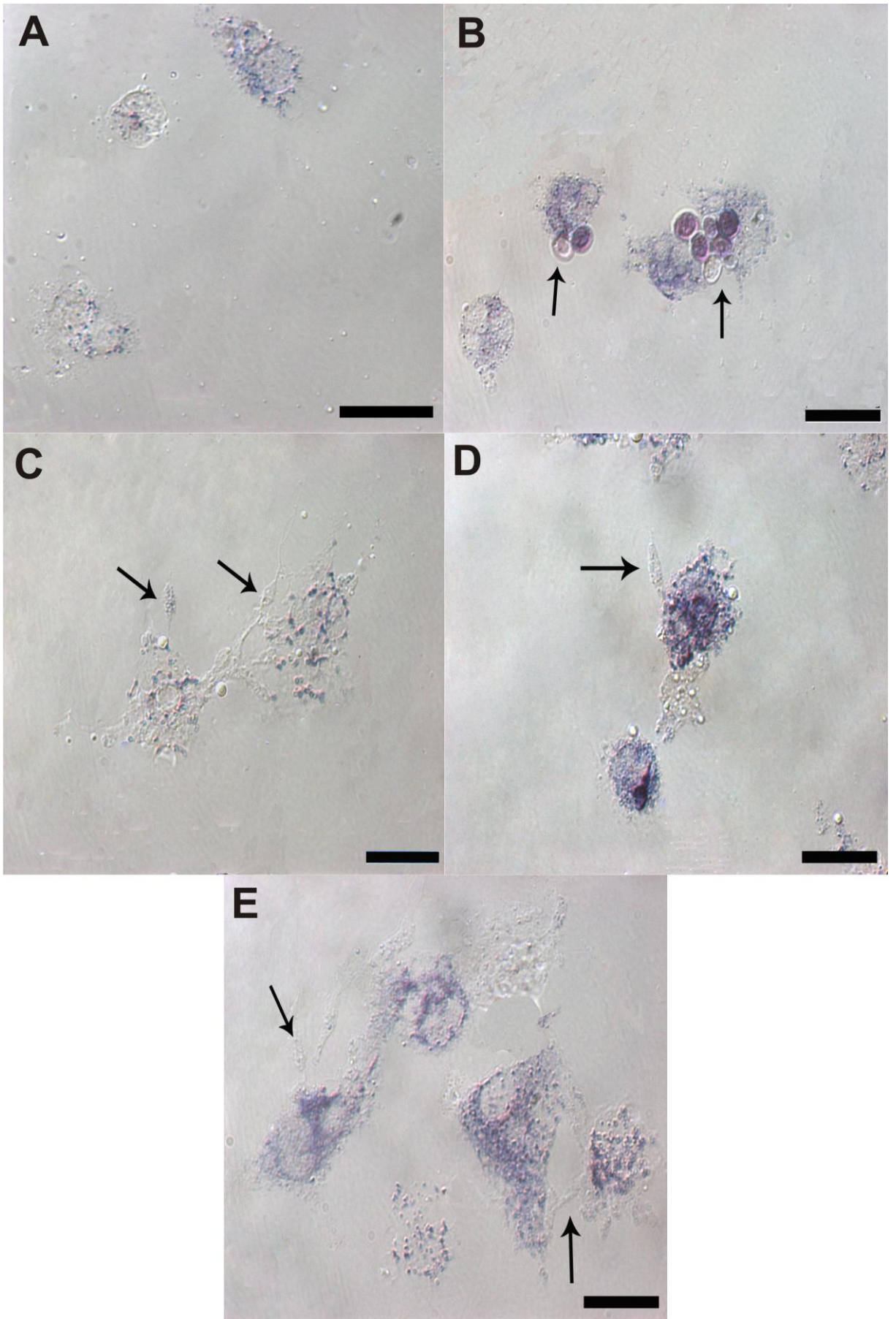


Figura 26. Detecção da produção de radicais superóxido através da reação com NBT em macrófagos tratados com o extrato aquoso de Pa por 1 hora. (A) Controle negativo da reação, macrófagos sem tratamento, observar a ausência da reação. (Inset) Controle positivo com macrófagos infectados com *Saccharomyces cerevisiae*. (B) Macrófagos tratados com 100 µg/ml do extrato, observar a produção de radicais por toda célula (seta). (C) Porcentagem de macrófagos marcados com o NBT.

5.8.2 Produção de superóxidos em macrófagos infectados e tratados com o extrato.

Para observar a possível resposta microbicida da célula foram realizados dois testes: Detecção de radicais e óxido nítrico. Não foi observada a produção de NO nas células tratadas (dados não mostrados), porém através da reação citotóxica com NBT foi possível detectar a produção de radicais superóxidos em macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com 50 e 100 µg/ml do extrato de Pa. Foi utilizado um controle com *L. amazonensis* para mostrar o bloqueio da produção de radicais por este parasita e um controle positivo com *Saccharomyces cerevisiae* para demonstrar a especificidade do teste. (Figura 27).

Figura 27. Detecção da produção espécies reativas de oxigênio através da reação com NBT em macrófagos infectados com *L. amazonensis* e tratados com o extrato aquoso de Pa por 1 hora. (A) Controle negativo da reação, macrófagos não tratados e não-infectados . (B) Controle positivo da reação, de macrófagos infectados com *Saccharomyces cerevisiae* da reação, observar a reação pontual no local da infecção (seta). (C) Controle de macrófagos infectados com *L. amazonensis* e sem tratamento, observar a ausência da reação causada pelo parasito (setas). (D) Macrófagos infectados e tratados com 50 µg/ml do extrato, observar contato entre o parasita e a célula (seta). (E) Macrófagos infectados e tratados com 100 µg/ml, observar a produção de reação, mesmo na presença da *Leishmania* (seta). Barras: 10 µm.



6. DISCUSSÃO

As plantas medicinais oferecem novas perspectivas para a descoberta de novos compostos com propriedades terapêuticas contra o parasita *Leishmania*. Extratos e infusões obtidos de espécies do gênero *Physalis* (Solanaceae) são amplamente utilizadas na medicina popular (LORENZI & MATOS, 2002). E por isso vários estudos demonstraram suas propriedades biológicas *in vitro* (BASTOS *et al.*, 2008; GARCIA *et al.*, 2006; GUIMARÃES *et al.*, 2009, 2010; PINTO *et al.*, 2010; SÁ *et al.*, 2011). No entanto, não há estudos na literatura que demonstram as alterações morfológicas sobre o parasita *Leishmania* e sua célula hospedeira que ocorre em resposta ao efeito do extrato da planta e seu mecanismo de ação.

Inicialmente foi verificado se o extrato da raiz de *P. angulata* possuía atividade leishmanicida contra as formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania (L.) amazonensis*. A partir dos resultados obtidos foi possível observar que houve uma redução significativa no crescimento de promastigotas de *L. amazonensis* após o tratamento com 50 e 100 µg/mL do extrato, sendo esta redução de 74,5% e 99,8%, respectivamente, representando um (IC₅₀ de 35,5 µg/mL).

Estudos descritos na literatura envolvendo flores e extratos de folhas de *Cymbopogon citratus*, *Matricaria chamomilla* e *Piper regnellii* Miq., utilizando concentração semelhante ao presente estudo, obtiveram uma redução de 98% contra promastigotas de *L. amazonensis* (LOUIZE *et al.*, 2005). O extrato de Pa possui um efeito inibidor no crescimento de promastigotas similar a estes extratos de plantas. No entanto, é mais potente do que plantas, *Tanacetum parthenium* e *Tanacetum vulgare* L., analisadas no mesmo estudo (LUIZE *et al.*, 2005).

No presente trabalho, o tratamento de formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis* com o extrato promoveu uma diminuição de 70,6% e 70,9% utilizando as concentrações de 50 e 100 µg/mL, respectivamente (IC₅₀ 32,0 µg/mL) após 72 h de tratamento. Luize *et al.*, 2005 observaram que os extratos das plantas *Cymbopogon citratus*, *Matricaria chamomilla* e *Piper regnellii* Miq apresentavam um efeito inibitório de 92% a 96% das formas amastigotas de *L. amazonensis*. No entanto, não é possível comparar diretamente o efeito inibitório com o do presente estudo, uma vez que os autores utilizaram culturas de amastigotas axênicas em vez de amastigotas intracelulares.

Os macrófagos representam a principal célula hospedeira do parasita. Estas células apresentam funções fagocíticas altamente especializadas. Atualmente vários estudos utilizando diferentes bioprodutos têm avaliado a capacidade de estimular macrófagos em

diferentes aspectos (GARCÍA *et al.*, 2002; LOPES *et al.*, 2006; RODRIGUES *et al.*, 2011). Para desempenhar suas funções, macrófagos são ativados pelo reconhecimento de diferentes tipos de moléculas presente nos microorganismos, assim como as moléculas produzidas pelo hospedeiro em resposta a infecções. Os macrófagos ativados alteram sua morfologia apresentando projeções citoplasmáticas, aumento da adesão e espraio celular, além de expressão de citocinas e ativação da resposta microbicida celular, como produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (BILITEWSKI *et al.*, 2008; GORDON & MARTINEZ, 2010).

Os resultados obtidos no presente trabalho demonstraram que o uso do extrato de Pa promoveu uma ativação destas células via produção de ROS em macrófagos infectados e não infectados com *L. amazonensis*, espécie que para escapar às defesas imunes do hospedeiro desenvolveu mecanismos sofisticados capazes de inibir a resposta microbicida da célula hospedeira (BALESTIERI *et al.*, 2004; CALEGARI-SILVA *et al.*, 2009).

Na literatura, há poucos estudos sobre a produção de ROS pelo extrato de Pa, e os que existem foram realizados em células neoplásicas da mucosa oral (LEE *et al.*, 2009), e em células de carcinoma renal (WU *et al.*, 2012). Espécies reativas de oxigênio medeiam muitos processos biológicos e patológicos importantes. Muitos estudos têm utilizado compostos naturais que induzem a geração de ROS em células tumorais ocasionando a morte celular por apoptose. No presente estudo, houve produção de ROS em macrófagos, porém essa produção não produziu efeitos citotóxicos para a célula hospedeira, pelo contrário, foi capaz de reverter à ação inibitória produzida pela espécie *L. amazonensis*. Entretanto, o extrato de Pa não induziu a produção de NO (dados não mostrados). Esse resultado está de acordo com estudos obtidos na literatura (SOARES *et al.*, 2003; KANG *et al.*, 2011).

Recentemente foi relatado na literatura que fisalinas B, F e G, purificadas a partir do caule de *P. angulata*, foram capazes de reduzir o número de parasitas intracelulares e percentagem de macrófagos infectados por *Leishmania*, em concentrações não citotóxicas para macrófagos (GUIMARÃES *et al.*, 2009, 2010) Porém, não existem estudos demonstrando as alterações morfológicas em promastigotas de *L. amazonensis* após o tratamento com o extrato da raiz de Pa e seu mecanismo de ação.

Diversas técnicas de microscopia podem ser utilizadas como ferramenta útil no estudo de drogas sobre microorganismos, principalmente para identificação de possíveis alterações ultraestruturais, na superfície celular, bem como alterações em organelas específicas do parasita. A identificação dessas alterações morfológicas pode ajudar a esclarecer o mecanismo de ação de drogas (VANNIER-SANTOS & DE CASTRO, 2009; ADADE & SOUTO-PADRÓN, 2010).

As observações ao microscópio óptico mostraram que o tratamento com o extrato nas concentrações de 50 ou 100 µg/mL, alterou significativamente promastigotas, causando uma redução do volume e arredondamento do corpo celular, bem como duplicação atípica do flagelo. Duran *et al.* (2008), observaram modificações semelhantes na forma do corpo e flagelo de promastigotas tratadas com o extrato etanólico de *Adana propolis*. No entanto, esses autores utilizaram concentrações de 250 e 500 µg/mL contra *L. tropica*. Essas alterações também foram observadas em 20% de promastigotas de *L. amazonensis* quando tratadas com o óleo de *Cymbopogon citratus* (SANTIN *et al.*, 2009). Está redução do volume celular foi mais proeminente em promastigotas tratadas com 100 µg/mL quando analisados por citometria de fluxo.

Ao analisar a ultraestrutura das formas promastigotas por MEV foi possível confirmar as alterações da forma das células, além de alteração na citocinese, o que sugere interferência no processo de divisão celular. Em uma revisão publicada por Adade & Souto-Pradrón (2010), os autores sugerem que estas alterações podem ser causadas pela interferência de compostos no processo de divisão celular. O processo de divisão de promastigotas de *L. amazonensis* tratados com o extrato de Pa iniciou no sentido pósterio-anterior em vez do sentido normal ântero-posterior (AMBIT *et al.*, 2011; WHEELER *et al.*, 2011), por isso é possível que o extrato tenha interferido o processo de divisão celular destas células.

As imagens de MEV também mostraram multi-septação do corpo celular e restos celulares. Estudos com o óleo de *Cymbopogon citratus* contra promastigotas de *L. chagasi* demonstraram multi-septos e encurtamento do corpo celular e flagelo (OLIVEIRA *et al.*, 2009). Estas alterações podem ser causadas pela desestabilização do citoesqueleto (ADADE & Souto-Pradrón, 2010).

Por MET as alterações na divisão celular causadas pelo tratamento com o extrato de Pa, antes observadas por microscopia óptica e MEV, foram confirmadas, pois é possível observar a célula com citocinese iniciada no sentido pósterio-anterior, assim como um única bolsa flagelar contendo dois flagelos. Nesta fase da divisão celular, onde a citocinese inicia, os flagelos, novo e antigo, já estão separados e individualizados na bolsa flagelar. (WHEELER *et al.*, 2011).

A análise por TEM revelou a presença de múltiplas vesículas na bolsa flagelar de promastigotas tratadas com Pa. A captação de macromoléculas por promastigotas ocorre através da bolsa flagelar, que é uma invaginação da membrana plasmática, desprovido de microtúbulos subpeliculares. Esta região é o único lugar onde ocorre atividade exocítica e endocítica do parasita (LANDFEAR & IGNATUSHCHENKO, 2001; DE SOUZA *et al.*,

2008). Em promastigotas submetidas ao tratamento com drogas, esse aumento da atividade exocítica, provavelmente ocorra devido à necessidade que o parasita tem de expulsar o composto que lhe é tóxico. (GUIMARÃES, RODRIGUES *et al.*, 2010; VENDRAMETTO *et al.*, 2010). É provável também, que as múltiplas vesículas no interior da bolsa flagelar de promastigotas de *L. amazonensis*, sejam para a remoção dos compostos tóxicos presentes no extrato.

Figuras semelhantes à mielina também foram observadas no interior da bolsa flagelar de promastigotas tratadas com o extrato de *P. angulata*. Essas figuras são decorrentes de fusões de membranas internas que formam estruturas concêntricas, o que pode ser indicativo de morte celular por processo autofágico (RODRIGUES *et al.*, 2002; SANTA-RITA *et al.*, 2004).

Outra importante alteração observada em promastigotas foi a duplicação e alteração na forma e tamanho do cinetoplasto. Vários autores, utilizando produtos naturais como, o óleo de *Ocimum gratissimum* e a julocrotina, um alcalóide proveniente da planta *Croton pullei var. glabrior*, demonstraram alterações semelhantes no cinetoplasto (UEDA-NAKAMURA *et al.*, 2006; GUIMARÃES, RODRIGUES *et al.*, 2010). O cinetoplasto é uma organela presente apenas em protozoários tripanossomatídeos e é, portanto, um alvo importante para ação de drogas, devido a sua função e estrutura única (DE SOUZA *et al.*, 2009; ADADE & SOUTO-PADRÓN, 2010; SEN & CHATTERJEE, 2011). Estas modificações no cinetoplasto demonstram que esses bioprodutos podem possuir uma ação seletiva sobre a organela.

Além das alterações morfológicas, foi observado por citometria de fluxo que o extrato de Pa induziu a externalização de fosfatidilserina (PS) em promastigotas de *L. amazonensis*. Estudos têm relatado a morte celular por apoptose em promastigotas após o tratamento com Anfotericina (LEE *et al.*, 2002) e Mitelfosine (PARIS *et al.*, 2004). Semelhante ação é observada por bioprodutos como, os extratos metanólicos de *Piper betle* (MISRA *et al.*, 2009) e o composto eupomatenóide-5, isolado das folhas de *Piper regnelli* (GARCIA *et al.*, 2013).

A morte celular programada em protistas parece ter características semelhantes aos organismos multicelulares, incluindo redução do volume celular, a perda de potencial de membrana mitocondrial, e a externalização de fosfatidilserina (DUSZENKO *et al.*, 2006). Assim, é provável que a atividade leishmanicida observada após o tratamento com Pa pode estar relacionada a morte celular por apoptose. No entanto, mais estudos e técnicas são necessários confirmar esse mecanismo de morte celular.

Para confirmar a seletividade da droga contra os parasitos, o extrato também foi testado em macrófagos. Para isso foram realizados três métodos de viabilidade celular: o

MTT, que avalia a atividade das desidrogenases mitocondriais, o JC-1, que avalia o potencial mitocondrial das células viáveis, e o IP que avalia a integridade das membranas plasmática. Em todos os ensaios de citotoxicidade não foram detectadas alterações significativas da viabilidade celular, demonstrando que o efeito do extrato aquoso foi específico sobre o protozoário.

Além da avaliação da resposta microbicida dos macrófagos infectados e não infectados com *L. amazonensis*, também foram observados aspectos morfológicos dessas células tratadas com o extrato de Pa. Primeiramente, foram analisadas por microscopia óptica de campo claro, onde apresentaram diferenças morfológicas como, espraçamento celular, projeções citoplasmáticas, aumento de volume e vacuolização, características típicas observadas em macrófagos ativados. Estas alterações foram confirmadas por imunofluorescência de macrófagos tratados com Pa, onde foi possível verificar um rearranjo dos microtúbulos e filamentos de actina com presença de projeções citoplasmáticas alterando a forma da célula. O citoesqueleto é responsável por manter a forma da célula, motilidade e migração. Além disso, tem a função de adesão celular, espraçamento, fagocitose, apresentação de antígenos, entre outras (MOSSER & EDWARDS, 2008; STRAMER *et al.*, 2010).

As extensões citoplasmáticas da membrana plasmática, principalmente de microtúbulos e filamentos de actina são necessários para a biogênese do fagossomo e para a fusão do lisossomo a ele (DAMIANI & COLOMBO, 2003; PATEL & HARRISON, 2009). Esta reorganização torna-se mais evidente em macrófagos metabolicamente ativos, que foram submetidos a diferentes estímulos (YAYOSHI-YAMAMOTO *et al.*, 2000; GORDON & MARTINE, 2010). A presença de filopódios, espraçamento e aumento do volume celular também foram observados através de MEV, confirmando as alterações na forma da célula.

A análise por MET confirmou os dados obtidos por microscopia óptica de campo claro, de fluorescência e MEV, e ainda revelou outras características importantes. Como um aparente aumento de vacúolos, retículo endoplasmático e complexo de Golgi, essas organelas estão em menor número em macrófagos residentes, e em macrófagos ativados indica que célula esteja com elevada atividade metabólica. Além disso, a análise ultraestrutural mostrou que os macrófagos não apresentavam núcleo apoptótico e organelas sem alterações morfológicas.

Outro dado importante desse estudo e que pela primeira vez foi demonstrado a presença das fisalinas D, E, F e G no extrato aquoso da raiz de *P. angulata*, e acreditamos que essas alterações morfológicas podem estar relacionadas com a presença dessas fisalinas no extrato. Guimarães *et al.*, 2009 ao observarem os efeitos das fisalinas sobre o protozoário

L.amazonensis utilizaram maior quantidade de plantas para purificar os compostos de *P. angulata*. Muitos fitomedicamentos, uma mistura de vários componentes, exercem os seus efeitos terapêuticos por meio da ação sinérgica de compostos, atuando em locais únicos ou múltiplos (GILBERT & ALVES, 2003; BRISKIN, 2000). Este mecanismo de sinergia parece ocorrer com o extrato e pode estar relacionada a estruturas das fisalinas, promovendo o alto desempenho observado. Além disso, infusões e misturas de plantas são amplamente utilizados na medicina popular tradicional, em vez dos compostos isolados. Extratos vegetais têm várias vantagens em relação às drogas porque contêm substâncias que podem inibir a multi resistência do parasita e são menos caros para produzir e distribuir (POLONIO & EFFERTH, 2008; RASOANAIVO *et al.*, 2011).

A partir dos resultados obtidos é possível sugerir que o extrato aquoso da planta *Physalis angulata*, torna-se uma fonte seletiva e promissora para estudos no desenvolvimento de um novo agente leishmanicida. Este estudo é parte de uma busca contínua de novos medicamentos que possam atuar de maneira eficaz contra doenças negligenciadas, como a Leishmaniose Tegumentar Americana.

7. CONCLUSÕES

Os resultados apresentados e discutidos permitem concluir que:

1. O extrato aquoso demonstrou atividade leishmanicida sobre formas promastigotas e amastigotas em macrófagos infectados e tratados;
2. A análise das alterações ultraestruturais nas formas promastigotas tratadas com o extrato, sugere que a droga parece afetar a divisão celular do parasito, provoca imodificações no cinetoplasto, na bolsa flagelar com aumento da atividade exocítica.
3. O extrato promoveu a morte celular por apoptose em promastigotas tratadas com o extrato.
4. O extrato foi capaz de ativar macrófagos peritoneais, uma vez que houve maior espriamento celular, aumento da quantidade de vacúlos, alterações no citoesqueleto e produção de espécies reativas de oxigênio.
5. O extrato não promoveu diminuição na viabilidade celular e nem modificações morfológicas nas organelas da célula hospedeira tratadas com o extrato aquoso.

8. PRODUÇÃO CIENTÍFICA

- **Manuscrito submetido para publicação:**

Silva, R. R. P., Rodrigues, A. P. D., Farias, L. H. S., Silva, M. N., Alves, D. T. V., Bastos, G. N. T., do Nascimento, J. L. M., Silva, E. O. “Antileishmanial activity of aqueous extract obtained from *Physalis angulata* roots and the selective action against *Leishmania (Leishmania) amazonensis* parasites”. *Evidence-Based complementary and Alternative Medicine* (Qualis A2). (Anexo I)

9. PARTICIPAÇÃO EM EVENTOS

- **XXVII Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Protozoologia/ XXXVIII Reunião Anual sobre Pesquisa básica em Doença de Chagas – 19-21 de setembro de 2011**

Trabalho apresentado: Morphological alterations of *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes treated with aqueous extract of *Physalis angulata* (Anexo II).

- **III Encontro Anual Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagem (INBEB) – 28-30 de novembro de 2011**

Trabalho apresentado (oral): Bioprodutos atividade leishmanicida e imunomoduladora (Anexo III).

- **10th Congresso Internacional de Biologia Celular -25-28 de Julho de 2012**

Trabalho apresentado: Murine macrophage cytoskeleton alterations caused by aqueous extract obtained from roots of *Physalis angulata*.(Anexo IV).

10. MESTRADO SANDUÍCHE

Mestrado sanduíche realizado no Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer, do Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho da Universidade Federal do Rio de Janeiro, no período de 17 de Outubro a 17 de novembro de 2011, através do PROCAD NF/2009 e INCT-INBEB (Anexo V).

11. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A.K.; LIGTHMAN, A.H.; PILLAI, S. **Biologia Celular e Molecular**. 7º Ed. Elsevier. Rio de Janeiro, p. 15-34, 2011.

ADADE C. M.; SOUTO-PADRON T. Contributions of Ultrastructural Studies to the Cell Biology of Trypanosomatids: Targets for Anti-Parasitic Drugs. **The Open Parasitology Journal**, v. 4, p. 178-187, 2010.

ALCOLEA, P.J. et al. Temperature increase prevails over acidification in gene expression modulation of amastigote differentiation in *Leishmania infantum*. **BMC Genomics**, v. 14, p. 11:31, 2010.

ALVAR, J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. **PLoS One**, v. 7, p. e35671, 2012.

AMBIT, A. et al. Morphological events during the cell cycle of *Leishmania major*. **Eukaryot Cell**, v. 10, n. 11, p. 1429-1438, 2011.

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

ANDRADE, B.B et al. Role of fly saliva in human and experimental leishmaniasis: current insights. **Scand J Immunol**, v. 66, p. 122-127, 2007.

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

ASILIAN, A. et al. Treatment of cutaneous leishmaniasis with aminosidine (paromomycin) ointment: double-blind, randomized trial in the Islamic Republic of Iran. **Bull World Health Organ**, v. 81, n.5, p. 353-359, 2003.

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

BALBANI, A.P.; SILVA, D.H.; MONTOVANI, J.C. Patents of drugs extracted from Brazilian medicinal plants. **Expert Opin Ther Pat**, v. 19, n. 4, p.461-473, 2009.

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

BARONI, A. et al. Cutaneous leishmaniasis treated with itraconazole. **Dermatol Ther**, v. 22, Suppl 1, p. S27-S29, 2009.

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

BASTOS, G.N.T. et al. *Physalis angulata* extract exerts anti-inflammatory effects in rats by inhibiting different pathways. **J Ethnopharmacol**, v. 118, n. 2, p. 246–251, 2008.

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

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

BILITEWSKI, U. Determination of immunomodulatory effects: focus on functional analysis of phagocytes as representatives of the innate immune system. **Anal Bioanal Chem**, v. 391, p. 1545-1554, 2008.

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

BRASIL. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. Série A. Normas e Manuais Técnicos. Brasília: Editora MS, 2ª Ed.atualizada, 2010. Disponível em: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_leishmaniose_tegumentar_america_na.pdf. Último acesso em: 20/03/2013.

BRASIL. MINISTERIO DA SAUDE, DEPARTAMENTO DE VIGILANCIA DA SAUDE. Sistema de Informacao de Agravos de Notificacao. **Serviço de Vigilância em Saúde**. Disponível em: http://portal.saude.gov.br/portal/arquivos/pdf/lta_casos08_09_11.pdf. Último acesso em: 20/03/2013.

BRAGA, F. G. et al. Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **J Ethnopharmacol**, v. 111, p. 396-402, 2007.

BRENZAN, M.A. et al. Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. **Parasitol Res**, v. 101, n. 3, p. 715-722, 2007.

BRISKIN, D.P. Medicinal plants and phytomedicines. Linking plant biochemistry and physiology to human health. **Plant Physiology**, vol. 124, no. 2, pp. 507-514, 2000.

CABRAL, M.M. et al. Neolignans from plants in northeastern Brazil (Lauraceae) with activity against *Trypanosoma cruzi*. **Exp Parasitol**, v. 124, n. 3, p. 319-324, 2010.

CÁCERES, A. et al. Antigonorrhoeal activity of plants used in Guatemala for the treatment of sexually transmitted diseases. **J Ethnopharmacol**, v. 48, n. 2, p. 85-88, 1995.

CALEGARI-SILVA, T.C. et al. NF-kappaB-mediated repression of iNOS expression in *Leishmania amazonensis* macrophage infection. **Immunol Lett**, v. 127, n. 1, p. 19-26, 2009.

CHAGAS, A.C. et al. Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA) em uma vila de exploração de minérios - Pitinga, município de Presidente Figueiredo, Amazonas, Brasil. **Brazilian journal of epidemiology**, v. 9, n. 2, p. 186-192, 2006.

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

CHANG, K.P.; MCGWIRE, B.S. Molecular determinants and regulation of *Leishmania* virulence. **Kinetoplastid Biol Dis**, v. 20, 1(1), p.1, 2002.

CHARMOY, M. et al. The prominent role of neutrophils during the initial phase of infection by *Leishmania* parasites. **J Biomed Biotechnol**, v. 2010, ID719361, 2010.

CHOI, E.M.; HWANG, J.K. Investigations of anti-inflammatory and antinociceptive activities of *Piper cubeba*, *Physalis angulata* and *Rosa hybrida*. **J Ethnopharmacol**, v. 89, n. 1, p.171-175, 2003.

CHOUDHARY, M.I. et al. Biotransformation of physalin H and leishmanicidal activity of its transformed products. **Chem Pharm Bull (Tokyo)**, v. 54, n. 7, p. 927-930, 2006.

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

COSTA, A.A. et al. Imaging exams of bone lesions in patients with diffuse cutaneous leishmaniasis (DCL). **Acta Trop**, v. 96, n. 1, p. 9-15, 2005.

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

CROFT, S.L. Monitoring drug resistance in leishmaniasis. **Trop Med Int Health**, v. 6, n. 11, p. 899-905, 2001.

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

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

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic Adaptive Mechanisms in Infection by *Leishmania*. **Exp Mol Pathol**, v. 72, p. 132-141. 2002.

DAMIANI, M.T.; COLOMBO, M.I. Microfilaments and microtubules regulate recycling from phagosomes. **Exp Cell Res**, v. 289, n. 1, p. 152-161, 2003.

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

DELORENZI, J.C. et al. Antileishmanial activity of na índole alkaloid from *Peschiera australis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 45, n. 5, p. 1349-1354, 2001.

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

DE SOUZA, W.; ATTIAS, M.; RODRIGUES, J.C. Particularities of mitochondrial structure in parasitic protists (Apicomplexa and Kinetoplastida). **Int J Biochem Cell Biol**, v. 41, n. 10, p. 2069-80, 2009a.

DE SOUZA, W.; SANT'ANNA, C.; CUNHA-E-SILVA, N. Electron microscopy and cytochemistry analysis of the endocytic pathway of pathogenic protozoa. **Progress Histochemistry and Cytochemistry**, v. 44, p. 67-124, 2009b.

DIAKONOVA, M.; BOKOCH, G.; SWANSON, J.A. Dynamics of Cytoeskeletal Proteins during Fc γ Receptor-mediated phagocytosis in Macrophages. **Mol Biology of the Cell**, v. 13, p. 402-411, 2002.

DOCAMPO, R. et al. Acidocalcisomes - conserved from bacteria to man. **Nature Reviews Microbiology**, v. 3, p. 251-261, 2005.

DUSZENKO, M. et al. Death of a trypanosome: a selfish altruism. **Trends Parasitol**, v. 22, n. 11, p. 536-42, 2006.

DURAN, G. et al. *In vitro* antileishmanial activity of Adana propolis samples on *Leishmania tropica*: a preliminary study. **Parasitol Res**, v. 102, n. 6, p. 1217-1225, 2008.

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

FIDALGO, L.M.; GILLE, L. Mitochondria and trypanosomatids: targets and drugs. **Pharm Res**, v. 28, n. 11, p. 2758-2770, 2011.

FIELD, M.C., CARRINGTON, M. The trypanosome flagellar pocket. **Nat Rev Microbiol**, v. 7, n. 11, p. 775-786, 2009.

FONSECA-SILVA, F. et al. Reactive oxygen species production and mitochondrial dysfunction contribute to quercetin-induced death in *Leishmania amazonensis*. **PLoS One**, v. 8;6(2), e14666, 2011.

FOTAKIS, G.; TIMBRELL, J. A. *In vitro* cytotoxicity assays: comparison of LDH, vermelho neutro, MTT and protein assay in hepatoma cell lines following exposure to cadmium chloride. **Toxicol Lett**, v. 160, p. 171-177, 2006.

FREIBURGHHAUS, F.; KAMINSKY, R.; NKUNYA, M.H.; BRUN, R. Evaluation of African medicinal plants for their *in vitro* trypanocidal activity. **J Ethnopharmacol**, v. 55 (1), p. 1-11, 1996.

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

GARCIA, D. et al. Modulation of rat macrophage function by the *Mangifera indica* L. extracts Vimang and mangiferin. **International Immunopharmacology**, v. 2, p. 797–806. 2002.

GARCIA, F.P. et al. Eupomatenoïd- 5 isolated from leaves of *Piper regnellii* induces Apoptosis in *Leishmania amazonensis*. **Evid Based Complement Alternat Med** v. 2013, p. 940531, 2013.

GARNIER, T. et al. *In-vitro* and *in-vivo* studies on a topical formulation of sitamaquine dihydrochloride for cutaneous leishmaniasis. **J Pharm Pharmacol**, v. 58(8), p. 1043-1054, 2006.

GILBERT, B.; ALVES, L.F. Synergy in plant medicines. **Current Medical Chemistry**, vol. 10, no. 1, pp. 13-20, 2003.

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

GORDON, S.; MARTINEZ, F.O. Alternative activation of macrophages: mechanism and functions. **Immunity**, v. 28;32(5), p. 593-604, 2010.

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

GRUENHEID, S.; FINLAY, B. Microbial pathogenesis and cytoskeletal function. **Nature**, 422(6933), p. 775-781, 2003.

GUIMARÃES, E.T. et al. Activity of physalins purified from *Physalis angulata* in *in vitro* and *in vivo* models of cutaneous leishmaniasis. **J Antimicrob Chemother**, v. 64 (1), p. 84-87, 2009.

GUIMARÃES, RODRIGUES. L. et al. Activity of the julocrotine, a glutarimide alkaloid from *Croton pullei* var. *glabrior*, on *Leishmania (L.) amazonensis*. **Parasitol Res**, v. 107(5), p.1075-1081, 2010.

GULL, K. The cytoskeleton of trypanosomatid parasites. **Annual Reviews in Microbiology**, v. 53, p. 629-655, 1999.

HEINSBROEK, S.E; GORDON, S. The role of macrophages in inflammatory bowel diseases. **Expert Rev Mol Med**, v. 14, 11:e14, 2009.

HWANG, J.K.; SHIM, J.S.; CHUNG, J.Y. Anticariogenic activity of some tropical medicinal plants against *Streptococcus mutans*. **Fitoterapia**, v. 75, n. 6, p. 596-598, 2004.

JAYANARAYAN, K.G.; DEY, C.S. Microtubules: dynamics, drug interaction and drug resistance in *Leishmania*. **J Clin Pharm Ther**, v. 27, n. 5, p. 313-320. 2002

JOSHI, P. B. et al. Targeted gene deletion in *Leishmania major* identifies leishmanolysin (GP63) as a virulence factor. **Mol Biochem Parasitol**, v. 120, p. 33-40, 2002.

KANG, H.; KWON, S.R.; CHOI, H.Y. Inhibitory effect of *Physalis alkekengi* L. Var *franchetii* extract and its chloroform fraction on LPS or LPS/IFN- γ stimulated inflammatory response in peritoneal macrophages. **J Ethnopharmacol**, v. 24, p. 95-101, 2011.

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

KIM, D.H. et al. Is paromomycin an effective and safe treatment against cutaneous leishmaniasis? A meta-analysis of 14 randomized controlled trials. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 3 n. 2, e381, 2009.

KOHL, L, GULL, K. Molecular architecture of the trypanosome cytoskeleton. **Mol Biochem Parasitol**, v. 15: 93(1), p. 1-9, 1998.

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

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

LANDFEAR, S.M.; IGNATUSHCHENKO, M. The flagellum and flagellar pocket of trypanosomatids. **Molecular and biochemical parasitology**, v.115, n. 1, p.1-17, 2001.

LAURELLA, L.C. et al. In *vitro* evaluation of antiprotozoal and antiviral activities of extracts from Argentinean Mikania species. **ScientificWorldJournal**, v. 2012, p. 121253, 2012.

LÁZARO-DIÉGUEZ, F. et al. Dynamics of an F-actin aggresome generated by the actin-stabilizing toxin jasplakinolide. **J Cell Sci**, v. 121, p. 1415-25, 2008.

LEE, N.S. et al. Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. **Cell Death & Differentiation**, vol. 9, no. 1, pp. 53-64, 2002.

LEE, H. Z. et al. Oxidative stress involvement in *Physalis angulata*-induced apoptosis in human oral cancer cells. **Food and Chemical Toxicology**, v. 47, p. 561–570, 2009.

LIN, Y.S. et al. Immunomodulatory activity of various fractions derived from *Physalis angulata* L. extract. **The American Journal of Chinese Medicine**, v. 20, p. 233–243, 1992.

LOPES, L. et al. Phagocytosis, endosomal/lysosomal system and other cellular aspects of macrophage activation by Canova medication. **Micron**, v. 37, p. 277-87, 2006.

LORENZI, H.; MATOS, F.J.A. Plantas medicinais no Brasil nativas e exóticas. **1º Ed. Nova Odessa, SP: Instituto Plantarum de estudos da flora**, p. 220–221, 2002.

LIU, D.; UZONNA, J.E. The early interaction of *Leishmania* with macrophages and dendritic cells and its influence on the host immune response. **Front Cell Infect Microbiol**, v. 2, p. 83. 2012.

LUIZE, P.S. et al. Effects of medicinal plant extracts on growth of *Leishmania (L.) amazonensis* and *Trypanosoma cruzi*. **Braz J Pharm Sci**, v. 41, p. 85–94, 2005.

LUSAKIBANZA, M. et al. In vitro and in vivo antimalarial and cytotoxic activity of five plants used in congolese traditional medicine. **J Ethnopharmacol**, v. 16:129 (3), p. 398-402, 2010.

MAGALHÃES, H.I. et al. *In-vitro* and *in-vivo* antitumour activity of physalins B and D from *Physalis angulata*. **J Pharm Pharmacol**, v. 58 (2), p. 235-241, 2006.

MAITY, P. C. et al. Potentiation by cigarette smoke of macrophage function against *Leishmania donovani* infection. **Inflamm Res**, v. 58, p. 22–29. 2009

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

MICHALICK, M.S.M.; RIBEIRO, R. Gênero *Leishmania*. In: NEVES, D.P. et al. **Parasitologia Humana** 12º Ed. São Paulo. Editora Atheneu. Cap. 7, p. 41-47, 2011.

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

MISRA, P. et al. Pro-apoptotic effect of the landrace Bangla Mahoba of *Piper betle* on *Leishmania donovani* may be due to the high content of eugenol. **J Med Microbiol**, v. 58(Pt 8), p. 1058-66, 2009.

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

MOUGNEAU, E.; BIHL, F.; GLAICHENHAUS, N. Cell biology and immunology of *Leishmania*. **Immunol Rev**, v. 240(1), p. 286-96, 2011.

MOSSER, D.M.; EDWARDS, J.P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nat Rev Immunol**, v. 8, p. 958-969, 2008.

NADERER, T.; MCCONVILLE, M. J. The *Leishmania*-macrophage interaction: a metabolic perspective. **Cell Microbiol**, v. 10, p. 301-308, 2008.

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

NORDBERG, J.; ARNÉR, E.S. Reactive oxygen species, antioxidants, and the mammalian thioredoxin system. **Free Radic Biol Med**, v. 31(11), p. 1287-1312, 2001.

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

OLIVEIRA, V.C. et al. Effects of essential oils from *Cymbopogon citratus* (DC) Stapf., *Lippia sidoides* Cham., and *Ocimum gratissimum* L. on growth and ultrastructure of *Leishmania chagasi* promastigotes. **Parasitol Res**, v. 104 (5), p.1053-1059, 2009.

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

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

OPPERDOES, F.R.; COOMBS, G.H. Metabolism of *Leishmania*: proven and predicted. **Trends in Parasitology**, v. 23, p. 149-158, 2007.

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

PARIS, C. et al. Miltefosine Induces Apoptosis-Like Death in *Leishmania donovani* promastigotes. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, vol. 48, no. 3, pp. 852-859, 2004.

PASSERO, L.F.; LAURENTI, M.D.; SANTOS-GOMES, G. Modelos Roedores Utilizados no Estudo da Leishmaniose Tegumentar Americana. In: BARRAL, A.; COSTA, J. **Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas**. Cap. 8, p. 75- 89, 2011.

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

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

PERELMAN, A. et al. JC-1: alternative excitation wavelengths facilitate mitochondrial membrane potential cytometry. **Cell Death Dis**, v. 22, p. 3:e430, 2012.

PINTO, N.B. et al. Topical anti-inflammatory potential of Physalin E from *Physalis angulata* on experimental dermatitis in mice. **Phytomedicine**, v. 17(10), p. 740-743, 2010.

PIRES, A.M.S. et al. Aspectos imunológicos da Leishmaniose Tegumentar Americana: Uma revisão. **Rev. Ciênc. Saúde**, v.14, n. 1, p. 30-39, 2012.

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

RASMUSSEN, B.; DESCOTEAUX, A. Contribution of Electron and confocal microscopy in the study of *Leishmania*-macrophage interactions. **Microsc Microanal**, v. 10, p. 656-661. 2004.

RODRIGUES, J.C.F. et al. Ultrastructural and biochemical alterations induced by 22, 26-azasterol, a $\Delta 24(25)$ -sterol methyltransferase inhibitor, on promastigote and amastigote forms of *Leishmania amazonensis*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 46, p. 487–499, 2002.

RODRIGUES, A.P.D. et al. Kojic acid, a secondary metabolite from *Aspergillus sp.*, acts as an inducer of macrophage activation. *Cell Biol Int*. v. 1, p. 335-343. 2011.

ROCHA, L.G. et al. A review of natural products with antileishmanial activity. **Phytomedicine**, v. 12(6-7), p. 514-35, 2005.

ROSA, M. S. S. et al. Antileishmanial Activity of a Linalool-Rich Essential Oil from *Croton cajucara*. **Antimicrob Agents Chemother**, v. 47(6), p. 1895-1901, 2003.

RASOANAIVO, P. et al. Whole plant extracts versus single compounds for the treatment of malaria: synergy and positive interactions”, **Malaria Journal**, vol. 10, no. (Suppl 1) S4, 2011.

ROTUREAU, B. et al. The flagellum-mitogen-activated protein kinase connection in Trypanosomatids: a key sensory role in parasite signaling and development?. **Cell Microbiol**, v. 11(5), p. 710-718, 2009.

SÁ, M.S. et al. Antimalarial activity of physalins B, D, F, and G. **J Nat. Prod**, v. 10, p. 2269-2272, 2011.

SAHASRABUDDHE, A.A.; VIRENDRA, K.B.; GUPTA, C.M. A novel form of actin in *Leishmania*: molecular characterization, subcellular localization and association with subpellicular microtubules. **Molecular and Biochemical Parasitology**, v. 134, p. 105-114, 2004.

SANCHES, E.G. et al. Evaluation of the antibacterial activity of *Physalis angulata* extract. **Bolletino Chimico Farmaceutico**, v. 2, p. 136, 1997.

SANTA-RITA, R.M. et al. Effect of the lysophospholipid analogues edelfosine, ilmofosine and miltefosine against *Leishmania amazonensis*. **J Antimicrob Chemother**, v. 54, p. 704–710, 2004.

SANTIN, M.R. et al. *In vitro* activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major component (citral) on *Leishmania amazonensis*. *Parasitol Res*, v. 105 (6), p.1489-1496, 2009.

SEN, R.; CHATTERJEE, M. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. **Phytomedicine: international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 18, n. 12, p. 1056-1069, 2011.

SILVA, M.T.G. et al. Evaluation of the bacteria inhibitory profile between native Belém do Pará and Rio de Janeiro 52 cultivated *P. angulata* L. species against *S. aureus*, *E. coli* e *K. pneumoniae*. **Bolletino chimico Farmaceutico**, v. 2, p. 138, 1999.

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

SILVA, M.T. Neutrophils and macrophages work in concert as inducers and effectors of adaptive immunity against extracellular and intracellular microbial pathogens. **J Leukoc Biol**, v. 87 (5), p. 805-813, 2010.

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

SILVEIRA, F.T. et al. Immunopathogenic competences of *Leishmania (V.) braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunol**, v. 31 (8), 423-431, 2009.

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

SKLAVOS, A.V. et al. Cutaneous leishmaniasis in a child treated with oral fluconazole. **Australas J Dermatol**, v. 51 (3), p. 195-197, 2010.

SMIT, E. et al. Differentiation of Human Monocytes in Vitro Following Exposure to Canova in the Absence of Cytokines. **Ultrastructural Pathology**, v. 32, p. 147-152. 2008.

SOARES, M.B.P. et al. Inhibition of macrophage activation and lipopolysaccharide-induced death by seco-steroids purified from *Physalis angulata* L. **European Journal of Pharmacology**, v. 459, p. 107-112, 2003.

SOTO, J. et al. Treatment of American cutaneous leishmaniasis with miltefosine, an oral agent. **Clin. Infect. Dis**, v. 33, E57-E61, 2001.

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

STRAMER, B. et al. Clasp- mediated microtubule budding regulates persistent motility and contact repulsion in *Drosophila* macrophages *in vivo*. **J Cell Biol**, v. 189, n, 4, p. 681-689, 2010.

SUNDAR, S. et al. Injectable paromomycin for Visceral leishmaniasis in India. **N Engl J Med** v. 21, 356(25), p. 2571-2581, 2007.

TANAKA, A. K.; GORIN, P. A. J.; STRAUS, A. H. Role of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* Amastigote Glycosphingolipids in Macrophage Infectivity. **Braz J Med Biol Res**, v. 40, 799-806. 2007.

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

TEMPONE, A.G. et al. Brazilian flora extracts as source of novel antileishmanial and antifungal compounds. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 103(5), p. 443-9, 2008.

TOMASSINI, T.C.B. et al. Gênero *Physalis*- Uma revisão sobre vitaesteróides. **Química Nova**, v. 23 (1), p. 47-57, 2000.

UEDA-NAKAMURA, T. et al. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. **Parasitol Int**, v. 55 (2), p. 99-105, 2006.

VALE, E. C. S. & FURTADO, T. Leishmaniose tegumentar no Brasil: revisão histórica da origem, expansão e etiologia. **An Bras Dermatol**, v. 80, p. 421-428, 2005.

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

VENDRAMETTO, M. C. et al. Evaluation of antileishmanial activity of eupomatenoid-5, a 19 compound isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallenscens*. **Parasitology International**, v. 59, p. 154–158, 2010.

WALLER, R.F.; MCCONVILLE, M.J. Developmental changes in lysosome morphology and function *Leishmania* parasites. **International Journal for Parasitology**, v. 32, p. 1435–1445, 2002.

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

WILSON, R. et al. Stage-specific adhesion of *Leishmania* promastigotes to sand fly midguts assessed using an improved comparative binding assay. **PLoS Negl Trop Dis**, v.7;4(9), pii: e816, 2010.

WORTMANN, G. et al. Liposomal amphotericin B for treatment of cutaneous leishmaniasis. **Am J Trop Med Hyg**, v. 83(5), p.1028-1033, 2010.

WU, S.Y. et al. *Physalis* F induces cell apoptosis in human renal carcinoma cells by targeting NF-KappaB and generating reactive oxygen species. **PLoS One**, v. 7(7), p. e40727, 2012.

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

YAYOSHI-YAMAMOTO, S.; TANIUCHI, I.; WATANABE, T. FRL, a novel formin-Related protein, binds to Rac and regulates cell motility and survival of macrophages. **Mol Cell Biol**, v. 20, n.18, p. 6872-6881, 2000.

ANEXOS

ANEXO I

MAUSCRITO SUBMETIDO PARA PUBLICAÇÃO



Hindawi Publishing Corporation

Edilene Silva Update My Account Logout


[Submit a Manuscript](#)
[Author Activities](#)

371030.v1 (Research Article)

Title	Antileishmanial activity of aqueous extract obtained from <i>Physalis angulata</i> roots and the selective action against <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> parasites
Journal	Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine
Issue	Regular
Additional Files	Cover Letter
Manuscript Number	371030 (Research Article)
Submitted On	2013-05-17
Authors	Raquel Raick Pereira da Silva, Ana Paula Drummond Rodrigues, Luis Henrique Seabra de Farias, Milton Nascimento da Silva, Danila Teresa Valeriano Alves, Gilmara Nazareth Tavares Bastos, J. L. M. do Nascimento, Edilene Silva
Editor	
Status	Under Review

ANEXO II

PARTICIPAÇÃO EM EVENTO



We hereby certify that the abstract entitled... *Morphological alterations of*
Leishmania (L.) amazonensis promastigotes treated with aqueous extract
of Physalis angulata.
 by authors... *Silva, R. R. P.; Rodrigues, A. P. D.; Farias, L. H. S.; Bastos, G. N. T.;*
Nascimento, J. L. M.; Garcia, C. A.; Costa, J. P.; Silva, B. J. M.; Silva, E. O.

.....
 was presented during the XXVII Annual Meeting of the Brazilian Society of Protozoology /
 XXXVIII Annual Meeting on Basic Research in Chagas' Disease in Foz do Iguaçu, Paraná,
 Brasil, from September 19th to 21st, 2011.

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'AKC', written over a light-colored rectangular area.

Angela Kaysel Cruz
 President

A handwritten signature in black ink, appearing to be 'MCE', written over a light-colored rectangular area.

M Carolina Elias
 Secretary

ANEXO III

PARTICIPAÇÃO EM EVENTO

III Encontro Anual do Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Biologia Estrutural e Bioimagem (INBEB)

Certificado

Certifico que **Raquel Raick Pereira da Silva** apresentou a palestra “**Bioprodutos: Ação Leishmanicida e imunomoduladora**” no III Encontro Anual do INBEB, realizado nos dias 28, 29 de novembro de 2011, na Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ).



Coordenador do INBEB
Professor Jerson Lima da Silva

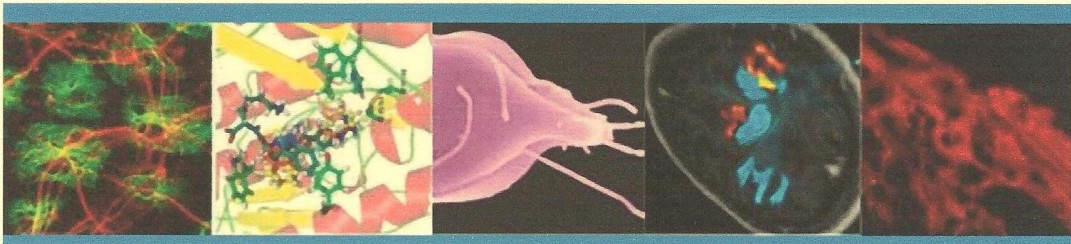
INBEB
Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia
de Biologia Estrutural e Bioimagem

CNPq
Conselho Nacional de Desenvolvimento
Científico e Tecnológico

FAPERJ
Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro

DECIT
Departamento de Ciência e Tecnologia

CAPEs



PARTICIPAÇÃO EM EVENTO



We certify that

RAQUEL RAICK PEREIRA DA SILVA, ANA PAULA DRUMMOND RODRIGUES, AMANDA ANASTÁCIA PINTO HAGE, GILMARA DE NAZARETH TAVARES BASTOS, EDILENE OLIVEIRA DA SILVA

presented the poster entitled

MURINE MACROPHAGE CYTOSKELETON ALTERATIONS CAUSED BY AQUEOUS EXTRACT OBTAINED FROM ROOTS OF PHYSALIS ANGULATA

during the 10th International Congress on Cell Biology and the XVI Meeting of the Brazilian Society for Cell Biology held at Riocentro Exhibition and Convention Center, Rio de Janeiro, Brazil, July 25th to 28th, 2012.

Hernandes F Carvalho



Hernandes F Carvalho
International Federation for Cell Biology IFCB

Patricia Gama



Patricia Gama
Brazilian Society for Cell Biology

Organizing Committee

Anne Eichmann | Bechara Kachar | Estela Bevilacqua | Flávia Gomes | Irene Yan
James Armitage | Marimélia Porcionatto | Marilice F Santos | Milton Moraes | Thereza Christina Barja -Fidalgo

ANEXO IV

MESTRADO SANDUÍCHE

Universidade Federal do Rio de Janeiro
Centro de Ciências da Saúde
Instituto de Biofísica Carlos Chagas Filho

**DECLARAÇÃO**

Declaro que aceito receber a aluna de mestrado RAQUEL RAICK PEREIRA DA SILVA, vinculada ao programa de pós-graduação de Neurociências e Biologia Celular, da Universidade Federal do Pará, para desenvolver missão de estudo no Laboratório Ultraestrutura Celular da Universidade Federal do Rio de Janeiro, pelo projeto intitulado “Cooperação Interinstitucional em Neurociências e Biologia Celular em Modelos Experimentais de Interesse da Região Amazônica”, aprovado no Programa Nacional de Cooperação Acadêmica – PROCAD-NF - Edital Capes 21/2009, sob minha coordenação pela IES Associada 1 PROCAD/NF 2009. Essa missão será realizada no período de 17 de outubro a 17 de novembro de 2011.

Rio de Janeiro, 19 de setembro de 2011.

Dr. Wanderley de Souza
Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas - Biofísica
Coordenador da Equipe da IES Associada 1 PROCAD/NF 2009
Laboratório de Ultraestrutura Celular Hertha Meyer

CCS - Bloco G - subsolo - Ilha do Fundão - 21941-902 - Rio de Janeiro RJ - Brasil
Tel: +55 21 2562-6593 / 2562-6583 - Fax: +55 21 2260-2364 - <http://www.biof.ufrj.br>