

UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ – *CAMPUS* DE CASCAVEL
CENTRO DE CIÊNCIAS MÉDICAS E FARMACÊUTICAS – CCMF
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS – PCF

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES TRIPANOCIDA, LEISHMANICIDA E
IMUNOMODULADORA DE EXTRATOS DE SEMENTES DE *Lonchocarpus
cultratus***

FERNANDA WEYAND BANHUK

CASCAVEL

2020

FERNANDA WEYAND BANHUK

**AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES TRIPANOCIDA, LEISHMANICIDA E
IMUNOMODULADORA DE EXTRATOS DE SEMENTES DE *Lonchocarpus
cultratus***

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual Oeste do Paraná, *campus* de Cascavel, em cumprimento parcial aos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas na linha de pesquisa Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Rafael Andrade Menolli

Coorientadora: Thais Soprani Ayala

CASCADEL - PR

2020

BIOGRAFIA RESUMIDA

Fernanda Weyand Banhuk, natural de Guarapuava, Paraná, Brasil, nascida em 18 de dezembro de 1993, graduou-se em Farmácia pela Universidade Estadual do Centro-Oeste – UNICENTRO, *campus* Cedeteg, em dezembro de 2015. Ingressou no Programa de Pós-Graduação *Lato Sensu* – Residência Farmacêutica em Análises Clínicas em março de 2016, finalizando-o em fevereiro de 2018. Em março de 2018, iniciou as atividades como aluna do Programa de Pós-Graduação *Stricto Sensu* em Ciências Farmacêuticas. Trabalhou como farmacêutica na União Oeste Paranaense de Estudos e Combate ao Câncer - UOPECCAN - em Cascavel, Paraná, Brasil, entre maio de 2018 e julho de 2018. Atualmente, é bolsista do programa pela CAPES e desenvolve projeto experimental de dissertação junto à linha de pesquisa Prospecção de Microrganismos e Substâncias Bioativas com Aplicações Biotecnológicas e em Saúde, orientada pelo Dr. Rafael Andrade Menolli.

“Posso todas as coisas por meio de Cristo, que me dá forças.”
Filipenses 4:13

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a Deus, pois Dele, por Ele e para Ele são todas as coisas. A Ele seja toda a glória para sempre!

À minha família – meus pais e irmãos, que estiveram ao meu lado não medindo esforços para que eu estivesse realizando este trabalho, e que sempre vibraram com as minhas conquistas.

Ao meu avô, que sempre foi a minha maior inspiração e fonte de sabedoria, com o qual pude ter a honra de conviver, mesmo com a distância, até o fim deste trabalho.

Ao meu namorado, pela leveza, paz e força transmitida.

Ao meu orientador e às minhas amigas do laboratório, por terem sido fundamentais em todo o processo de aprendizagem e crescimento.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a Deus e a Seu filho, Jesus Cristo. Foi por meio Deles que tudo se tornou possível. Foi durante os dois anos de mestrado que busquei conhecê-los diariamente e tive a graça de encontrá-los sempre. Por todo amor e força.

À minha mãe Mariza, por ser o exemplo de mulher forte e determinada e por sempre estar ao meu lado. Por todo apoio durante a minha vida, por sempre acreditar em mim e na minha capacidade. Por me inspirar, me amar e me dar forças todos os dias, mesmo de longe.

Ao meu pai Osmar Sérgio, por toda dedicação e amor. Por sempre acreditar em mim e me ajudar em tudo. Por permanecer forte mesmo nos momentos mais difíceis. Por também ser minha inspiração e razão.

Aos meus irmãos Bruno e Ana Júlia, que são meus mais novos pilares. Por toda compreensão, por estarem ao meu lado em todos os momentos. Por não medirem esforços para que isso se tornasse possível. Por permanecerem fortes o suficiente ao meu lado para que eu pudesse concluir esse trabalho.

Ao meu avô Egon Weyand, por ter sido a pessoa mais incrível e sábia que eu pude conhecer. Por todas as memórias que deixou.

Ao meu namorado Alex, pela companhia, por embarcar na aventura que foi adotar o Trovão. Pela paz nos momentos de tempestade. Por me inspirar a ser melhor a cada dia. Pela dedicação, leveza e amor.

Ao meu orientador Rafael Andrade Menolli, pela confiança, competência, sabedoria, paciência, apoio e dedicação. Por proporcionar todo o aprendizado e experiência. Sou muito grata por tê-lo como professor e orientador.

À minha coorientadora Thais Soprani Ayala, pela inspiração, amizade e alegria. Pelas ideias e experiências compartilhadas durante os dias de experimento e pelos momentos de distração e comemorações.

À minha amiga e dupla de laboratório Izabela Virginia Staffen, por todos os momentos que compartilhamos. Pela confiança, sabedoria, paciência e amizade. Por todos os fins de semana de experimentos. Por ter sido minha companheira de leitura de lâminas e contagens durante as longas tardes no laboratório e por ter proporcionado tantos momentos felizes e engraçados. Por ter permanecido ao meu lado me dando forças sempre.

Às minhas amigas Janaína e Claudia, pela companhia diária, por todas as conversas, cafés, chás, bolos, almoços e comemorações. Por me proporcionarem tantos momentos de alegria e paz durante os últimos dois anos.

Às minhas amigas Ana Paula, Karen, Dayane, Taimara e Taise, pela amizade, por todo apoio e incentivo e por estarem presentes sempre que possível.

Ao apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), sem o qual este trabalho não poderia ter sido realizado. À coordenação do Programa de Ciências Farmacêuticas (PCF) e à Universidade Estadual do Oeste do Paraná (UNIOESTE).

AVALIAÇÃO DAS ATIVIDADES TRIPANOCIDA, LEISHMANICIDA E IMUNOMODULADORA DE EXTRATOS DE SEMENTES DE *Lonchocarpus cultratus*

RESUMO

A doença de Chagas e a leishmaniose mostram a necessidade constante da busca de novos medicamentos que sejam mais eficientes e seguros para o tratamento. Ampliar o conhecimento acerca da citotoxicidade e do potencial de espécies vegetais é de fundamental importância, a fim de se obter novas opções terapêuticas. As plantas do gênero *Lonchocarpus* estão dentre as plantas com alto potencial medicinal devido à grande variedade de componentes bioativos, apresentando diferentes atividades biológicas, incluindo as atividades tripanocida e leishmanicida. A espécie *Lonchocarpus cultratus* (*L. cultratus*) apresenta em sua composição chalconas, como a lonchocarpina e a isocordoína, esteroides e terpenos. Por não existirem muitos trabalhos a respeito da sua atividade antiparasitária, o presente trabalho teve como objetivo investigar a citotoxicidade e a ação sobre a imunomodulação dos macrófagos e contra os parasitas *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) e *Leishmania amazonensis* (*L. amazonensis*) de extratos obtidos das sementes de *L. cultratus* *in vitro*, visando seu uso *in vivo*. Quando avaliados pela metodologia colorimétrica de redução do sal de tetrazolium MTT à formazan, os extratos hexânico e metanólico de *L. cultratus* (LHS e LMS, respectivamente) não apresentaram citotoxicidade em macrófagos murinos e o extrato diclorometânico de *L. cultratus* (LDS) foi citotóxico nas concentrações mais altas. Os três extratos não estimularam a liberação de óxido nítrico, nem inibiram essa liberação em macrófagos estimulados por lipopolissacarídeo (LPS). Os extratos LDS e LMS foram os que apresentaram maior atividade contra as formas *T. cruzi* testadas, em suas concentrações mais altas, com valores próximos ao observado pelo Benzonidazol, medicamento utilizado no tratamento da doença de Chagas. Os três extratos apresentaram atividade significativa sobre o índice de internalização de amastigotas de *T. cruzi*. Os extratos LDS e LHS foram os que se apresentaram mais ativos contra as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, com valores próximos do encontrado para o Glucantime®, controle positivo de tratamento. Por ter sido citotóxico para os macrófagos murinos, o LDS apresentou baixos índices de seletividade para ambos os parasitas. Os três extratos não estimularam a liberação da interleucina 1-beta e da interleucina 10 (IL-1 β e IL-10, respectivamente) e, uma vez que não alteraram a liberação de NO, sugere-se que exerceram atividade antiparasitária direta sobre os parasitas. Há a necessidade da realização de ensaios mais aprofundados e de buscar conhecer os mecanismos pelos quais os extratos exercem essas ações, a fim de se obter uma alternativa terapêutica potencial para as patologias tratadas neste estudo.

PALAVRAS-CHAVE: Doença de Chagas, leishmanioses, extratos naturais, atividade anti-*T. cruzi*, atividade anti-*Leishmania*

EVALUATION OF TRIPANOCIDAL, LEISHMANICIDAL AND IMMUNOMODULATORY ACTIVITIES OF *Lonchocarpus cultratus* SEED EXTRACTS

ABSTRACT

Chagas disease and leishmaniasis expose the need for searching more effective and safer new medicinal drugs. To broaden the knowledge about cytotoxicity and the potential of plant species is of utmost importance to obtain new therapeutic options. Plants of the genus *Lonchocarpus* have high medicinal potential due to the wide variety of bioactive components, presenting different biological activities, including trypanocidal and leishmanicidal activities. *Lonchocarpus cultratus* (*L. cultratus*) species features chalcones as lonchocarpine and isocordoin, steroids, and terpenes. The lack of studies on antiparasitic activity has propelled this research to investigate cytotoxicity, the action on the immunomodulation of macrophages, and the response against two parasites: *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*) and *Leishmania amazonensis* (*L. amazonensis*). The extracts were obtained from the seeds of *L. cultratus* *in vitro*, focusing on *in vivo* use. When evaluated by the colorimetric methodology of reducing MTT tetrazolium salt to formazan, the hexanic and methanolic extracts of *L. cultratus* (LHS and LMS respectively) did not show cytotoxicity in murine macrophages. The dichloromethane extract of *L. cultratus* (LDS) was cytotoxic at the highest concentrations. The three extracts neither stimulate the release of nitric oxide nor inhibit it in macrophages under lipopolysaccharide (LPS) stimuli. The LDS and LMS extracts presented the highest activity against the tested *T. cruzi* forms, in their highest concentrations, with values close to those observed for Benzonidazole, used for the treatment of Chagas disease. The three extracts showed significant activity on the infection rate of *T. cruzi* amastigotes. The LDS and LHS extracts were the most active against the promastigote and amastigote forms of *L. amazonensis*, with values close to that found for Glucantime®, a positive treatment control. LDS showed low rates of selectivity for both parasites, as it was cytotoxic to murine macrophages. The three extracts did not stimulate the release of interleukin 1-beta and interleukin 10 (IL-1 β and IL-10, respectively). Since they did not alter the release of NO, they may have exerted direct antiparasitic activity on parasites. There is a need to perform more in-depth tests to know the mechanisms by which the extracts exercise these actions, in order to obtain a potential therapeutic alternative for the pathologies treated in this study.

KEYWORDS: Chagas disease, leishmaniasis, natural extracts, anti-*T.cruzi* activity, anti-*Leishmania* activity.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	11
2. OBJETIVO GERAL	13
2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	13
3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	14
3.1. Doenças tropicais negligenciadas.....	14
3.2. Doença de Chagas	15
3.3. Leishmanioses	21
3.4. Ativação de macrófagos.....	28
3.5. <i>Lonchocarpus cultratus</i>	31
4. MATERIAL E MÉTODOS	35
4.1. Obtenção dos extratos	35
4.3. Obtenção de macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos	35
4.4. Determinação da viabilidade celular (citotoxicidade).....	36
4.5. Avaliação do efeito dos compostos na secreção de óxido nítrico	37
4.7. Avaliação da atividade tripanocida dos extratos sobre formas tripomastigotas <i>in vitro</i>	38
4.8. Avaliação da atividade tripanocida dos extratos sobre formas amastigotas <i>in vitro</i>	39
4.9. Avaliação da atividade leishmanicida dos extratos sobre formas promastigotas <i>in vitro</i>	40
4.10. Avaliação da atividade leishmanicida dos extratos sobre formas amastigotas <i>in vitro</i>	41
4.12. Análise estatística	42
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1. Obtenção dos extratos	43
5.2. Caracterização dos extratos	43
5.3. Viabilidade celular.....	44
5.4. Liberação e inibição de NO pelos macrófagos murinos peritoneais.....	47
5.5. Atividade tripanocida <i>in vitro</i>	50
5.6. Atividade leishmanicida <i>in vitro</i>	54
5.7. Liberação de citocinas: IL-1 β e IL-10.....	59
6. CONCLUSÃO.....	61
7. REFERÊNCIAS	62
8. ANEXO	76

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Classificação botânica de <i>L. cultratus</i>	32
Tabela 2 Concentração citotóxica de 50% (CC ₅₀) dos extratos LDS, LHS e LMS contra macrófagos peritoneais de camundongos.....	45
Tabela 3 Valores de CL ₅₀ , CI ₅₀ e CC ₅₀ dos extratos diclorometânico, hexânico e metanólico das sementes de <i>L. cultratus</i> sobre as formas tripomastigotas e amastigotas de <i>T. cruzi</i> e sobre os macrófagos murinos e respectivos índices de seletividades.....	52
Tabela 4 Valores de CI ₅₀ e CC ₅₀ atingidos pelos extratos diclorometânico, hexânico e metanólico das sementes de <i>L. cultratus</i> sobre as formas promastigotas e amastigotas de <i>L. amazonensis</i> e sobre os macrófagos murinos e respectivo índice de seletividade.	56

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 Microscopia óptica das diferentes formas evolutivas do <i>Trypanosoma cruzi</i>	16
Figura 2 Ciclo de vida de <i>Trypanosoma cruzi</i> , causador da doença de Chagas.....	17
Figura 3 Formas morfológicas de <i>Leishmania sp.</i>	23
Figura 4 Ciclo de vida dos parasitas do gênero <i>Leishmania</i> , causador da doença leishmaniose	25
Figura 5 Fotos de <i>Lonchocarpus cultratus</i>	33
Figura 6 Esquema de obtenção dos extratos LHS, LDS e LMS.....	43
Figura 7 Efeito dos extratos (a) diclorometânico, (b) hexânico e (c) metanólico das sementes de <i>L. cultratus</i> sobre a viabilidade de macrófagos murinos	46
Figura 8 Efeito do Benzonidazol (a) e Glucantime® (b) sobre a viabilidade de macrófagos murinos.....	47
Figura 9 Efeito dos extratos (a) diclorometânico, (b) hexânico e (c) metanólico das sementes de <i>L. cultratus</i> sobre a liberação de NO em macrófagos murinos	48
Figura 10 Efeito dos extratos (a) diclorometânico, (b) hexânico e (c) metanólico das sementes de <i>L. cultratus</i> sobre a inibição da liberação de NO em macrófagos murinos.....	49
Figura 11 Efeito dos extratos (a) diclorometânico, (b) hexânico e (c) metanólico das sementes de <i>L. cultratus</i> sobre forma tripomastigota de <i>T. cruzi</i>	51
Figura 12 Efeito dos extratos (a) diclorometânico, (b) hexânico e (c) metanólico das sementes de <i>L. cultratus</i> sobre o índice de internalização (número de macrófago infectados versus número de amastigotas) de <i>T. cruzi</i>	53
Figura 13 Efeito dos extratos (a) diclorometânico, (b) hexânico e (c) metanólico das sementes de <i>L. cultratus</i> sobre promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	55
Figura 14 Efeito dos extratos (a) diclorometânico, (b) hexânico e (c) metanólico das sementes de <i>L. cultratus</i> sobre o índice de internalização (número de macrófago infectados versus número de amastigotas) de <i>L. amazonensis</i>	57
Figura 15 Liberação de IL-1 β por macrófagos murinos peritoneais previamente infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com os extratos (a) diclorometânico, (b) hexânico e (c) metanólico das sementes de <i>L. cultratus</i> por 48 horas.....	60

1. INTRODUÇÃO

As Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) são consideradas um grande problema de saúde pública, que afeta principalmente populações em situações precárias de vida. Dentre as DTN's estão a Doença de Chagas (DC), também conhecida como Tripanossomíase Americana, resultante da infecção causada pelo protozoário hemoflagelado *Trypanosoma cruzi* (*T. cruzi*), e a Leishmaniose, uma antropozoonose que compõe um espectro de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania*.

Esse grupo de doenças está distribuído mundialmente em regiões tropicais e subtropicais, com a capacidade de se adaptar a diferentes ecossistemas e acometer diferentes espécies de mamíferos, incluindo o homem.

Descrita pela primeira vez há mais de 100 anos pelo cientista brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (1879-1934), a doença de Chagas é inicialmente uma doença silenciosa, que se desenvolve em dois estágios: fase aguda e fase crônica. A fase crônica da doença de Chagas se subdivide em assintomática (indeterminada) e sintomática. Cerca de 30-40% dos pacientes crônicos assintomáticos evoluem para sintomáticos.

Entre os mecanismos primários de transmissão aos seres humanos estão: via vetor, transfusão de sangue e órgãos, transmissão oral, placentária (ou congênita) e através do canal de parto no momento do nascimento.

A transmissão vetorial da doença de Chagas ocorre, classicamente, pelo contato com as fezes do inseto vetor contaminadas com parasitas, após este ter se alimentado com o sangue do hospedeiro; ao penetrar no hospedeiro vertebrado, os parasitas se multiplicam em uma enorme variedade de células nucleadas, onde desenvolvem-se.

Já as doenças causadas pelo gênero *Leishmania* são capazes de afetar a pele, mucosas e órgãos internos. Estes protozoários são parasitas intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear. Apresentam-se em duas formas morfológicas principais durante seu ciclo de vida: promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor; e amastigota, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados. A transmissão ocorre através da picada do flebotomíneo infectado.

A doença de Chagas e as leishmanioses têm elevada incidência e ampla distribuição geográfica nas Américas e continuam sendo um desafio para os programas nacionais e regionais, que requerem um grande esforço técnico, operativo

e político para manterem o desenvolvimento sistemático de ações de vigilância, prevenção e controle dessas patologias.

Além disso, observa-se uma limitada disponibilidade de medicamentos para o tratamento dessas doenças e, ainda, os medicamentos disponíveis apresentam diversos efeitos adversos e tóxicos, além de difícil administração e altas taxas de intolerância pelos usuários.

Assim, a pesquisa por novas drogas antiparasitárias contra diferentes formas de *T. cruzi* e de *Leishmania*, com menor toxicidade para o usuário, se torna necessária. Nesse sentido, a biodiversidade de espécies vegetais brasileiras pode ser considerada como fonte dessas substâncias, já que apresenta elevada quantidade de compostos bioativos.

Dentre as plantas com alto potencial medicinal, as do gênero *Lonchocarpus* destacam-se por apresentarem componentes químicos bioativos que podem exercer diversas atividades biológicas, incluindo a atividade anti-*Trypanossoma cruzi*. A revisão bibliográfica mostra que a espécie *Lonchocarpus cultratus* (*L. cultratus*) é pouco estudada e, por isso, dentro desse contexto e dando continuidade aos estudos do grupo de pesquisa, optou-se por verificar se os extratos obtidos das sementes de *L. cultratus* exercem essa atividade e, ainda, verificar seu potencial como leishmanicida e imunomoduladora, além de caracterizar seus constituintes e avaliar a citotoxicidade desses extratos.

2. OBJETIVO GERAL

O objetivo deste estudo é avaliar a citotoxicidade, a ação e a atividade imunomoduladora dos extratos hexânico, diclorometânico e metanólico obtidos das sementes de *Lonchocarpus cultratus* contra os parasitas *Trypanossoma cruzi* e *Leishmania amazonenses*, além investigar os possíveis mecanismos envolvidos nessas atividades.

2.1. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Analisar a citotoxicidade dos extratos obtidos das sementes de *Lonchocarpus cultratus* sobre macrófagos peritoneais de Balb/C;
- Analisar a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais estimulados pelos extratos;
- Analisar a inibição da liberação de NO pelos extratos em macrófagos peritoneais estimulados pelo lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano;
- Analisar a atividade dos extratos sobre as formas tripomastigota e amastigota de *Trypanossoma cruzi in vitro*;
- Analisar a atividade dos extratos sobre as formas promastigota e amastigota de *Leishmania amazonensis in vitro*;
- Analisar a secreção de interleucina 1 β e de interleucina 10 (IL-1 β e IL-10) por macrófagos peritoneais previamente infectados por *Leishmania amazonensis* e estimulados pelos extratos.

3. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

3.1. Doenças tropicais negligenciadas

A Organização Mundial da Saúde (OMS) define as Doenças Tropicais Negligenciadas (DTNs) como doenças tropicais endêmicas e epidêmicas crônicas, que têm um impacto negativo significativo sobre a vida das populações pobres, permanecendo criticamente negligenciadas na agenda global de saúde pública (PAHO/WHO, 2018). Compõem um grupo de doenças causadas por agentes infecciosos ou parasitas e, juntas, afetam de 2 a 7 bilhões de pessoas que vivem com menos de U\$ 2 dólares por dia, causando milhões de mortes e condições de invalidez anualmente (VASCONCELOS; KOVALESKI; JUNIOR, 2015). Esse grupo de doenças traz graves consequências econômicas, psicológicas e sociais, que incapacitam milhões de pessoas atingidas (DIAS e DESSOY, 2013).

A razão pelo maior acometimento da população de países subdesenvolvidos é consequência do processo desigual de desenvolvimento econômico mundial, haja que a prevalência das DTNs está diretamente ligada à dificuldade de desenvolvimento da comunidade, à marginalização e pobreza extrema (VASCONCELOS; KOVALESKI; JUNIOR, 2015).

A maioria das DTNs apresenta baixo índice de mortalidade, contudo, desfigura ou incapacita o paciente acometido. O impacto que estas consequências têm na população pode ser determinado, para cada doença, pelo índice “Anos de Vida Ajustado por Incapacidade”, do inglês, Disability Adjust Life Years (DALYs), calculado a partir da soma dos anos de vida perdidos devido à morte prematura e/ou incapacitação dos doentes que poderiam gerar o desenvolvimento econômico de sua região (VASCONCELOS; KOVALESKI; JUNIOR, 2015).

Apesar dos prejuízos causados pelas DTNs, o financiamento que existe para pesquisas nesse âmbito não resulta em avanços terapêuticos. Isso ocorre devido à pequena relevância que a indústria farmacêutica proporciona a esse objeto de estudo, motivada pelo baixo retorno lucrativo, visto que a população atingida por essas doenças é de baixa renda e, em geral, presente nos países em desenvolvimento (BAKER et al., 2010; CONTEH; ENGELS; MOLYNEUX, 2010; DECIT, 2010; GYAPONG et al., 2010; LIESE; ROSENBERG; SCHRATZ, 2010).

Segundo lista da OMS (PAHO/WHO, 2017), existem 21 DTNs em todo o mundo, sendo que cada país possui pelo menos uma delas de forma endêmica. As infecções podem ser causadas por vírus, bactérias, protozoários ou helmintos. Dentre

as patologias causadas por protozoários estão a Doença de Chagas e a Leishmaniose (VASCONCELOS; KOVALESKI; JUNIOR, 2015; PAHO/WHO, 2018).

Estima-se que no mundo existam oito milhões de pessoas infectadas pelo *T. cruzi*, sendo 5,7 milhões de pessoas em 21 países da América Latina. Além disso, calcula-se que 70 milhões de pessoas estejam em risco de contrair a doença (DNDI, 2017).

Quanto à leishmaniose, estima-se que esta afeta atualmente pelo menos 12 milhões de pessoas, com uma incidência estimada de 2 milhões de novos casos anuais (1,5 milhão de leishmaniose cutânea e 500.000 de forma visceral) em 88 países (WHO, 2017).

3.2. Doença de Chagas

A Doença de Chagas, também conhecida como Tripanossomíase Americana, é causada pelo protozoário flagelado *T. cruzi* (WHO, 2017), tendo sido descrita pela primeira vez em 1909 pelo cientista brasileiro Carlos Ribeiro Justiniano Chagas (1879-1934).

Mesmo com os avanços no controle da doença em países endêmicos, mais de um século após esta descoberta, a enfermidade se mantém como um processo mórbido e relevante para a saúde pública de diversos países no mundo, principalmente de regiões tropicais com baixo desenvolvimento social (OPAS, 2009).

O agente etiológico da doença de Chagas, o *T. cruzi*, é transmitido principalmente (mais de 80% das infecções registradas) por insetos hemíptera – triatomíneos -, que têm nomes diferentes em diferentes lugares nas Américas: “barbeiro”, vinchucas”, “pitos”, “chirimachas” entre outros (ARGOLO et al., 2008; PAHO, 2019).

Dentro desta subfamília de insetos hematófagos, a maioria dos casos da doença de Chagas são atribuíveis às seguintes espécies domésticas, sendo os principais vetores para a transmissão do parasita: *Rhodnius prolixus*, *Triatoma dimidiata* e *Triatoma infestans* (GALVÃO; CARVALHO; ROCHA, 2003; COURA, 2015; VASCONCELOS; KOVALESKI; JUNIOR, 2015; PAHO, 2019).

O *T. cruzi* tem como principal característica estrutural a presença de um flagelo e ciclo de vida com diversas morfologias, denominadas como: tripomastigota sanguícola, epimastigota, tripomastigota metacíclica e amastigota, representadas na figura 1 (FIOCRUZ, 2009; CDC, 2019).

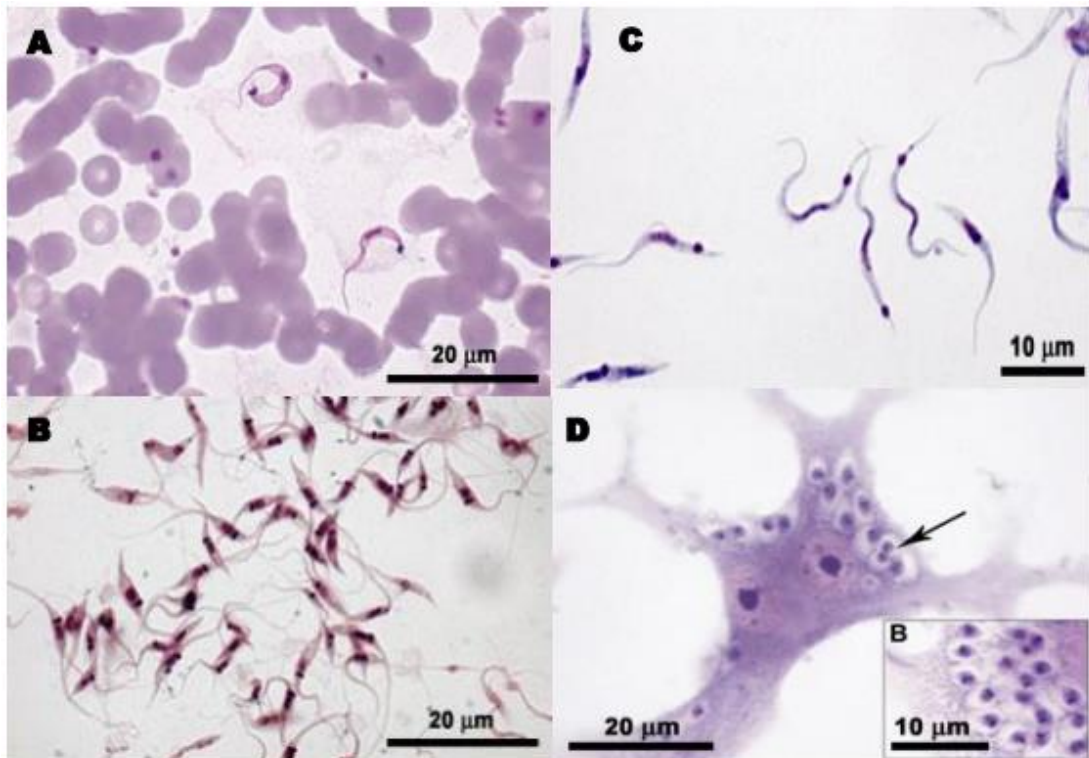


Figura 1 Microscopia óptica das diferentes formas evolutivas do *Trypanosoma cruzi*. A) Formas tripomastigotas sanguíneas de *T. cruzi*; B) Formas epimastigotas de *T. cruzi*; C) Formas tripomastigotas metacíclicas de *T. cruzi*; D) Formas amastigotas de *T. cruzi*. Fonte: CARVALHO, 2020 adaptado. Disponível em: <<http://chagas.fiocruz.br/organizacao-estrutural/>> Acesso em 27/01/2020.

A forma tripomastigota é alongada e o flagelo se estende por toda a célula e torna-se livre somente na porção anterior. É encontrada na circulação sanguínea do hospedeiro vertebrado – tripomastigota de corrente sanguínea (Figura 1 a), podendo estar presente também nos espaços intersticiais celulares, no líquido cefalorraquidiano, leite, esperma e em culturas celulares laboratoriais. As formas tripomastigotas são chamadas de tripomastigotas metacíclicas (Figura 1 c) quando liberadas nas fezes do vetor, sendo responsáveis então, pela infecção do hospedeiro vertebrado (ARGOLO et al., 2008).

A forma epimastigota (Figura 1 b) também é alongada, mas com o flagelo livre. Esta é a forma de replicação no vetor, que se encontra no intestino médio do inseto e nos meios líquidos de culturas laboratoriais (REY, 2001). A forma amastigota (Figura 1 d) é arredondada ou ovalada, com um flagelo curto que não se exterioriza. Esta é a forma de replicação nas células do hospedeiro vertebrado e pode estar presente nas células das fibras musculares estriadas, nas lisas, no sistema fagocítico mononuclear e nas culturas celulares (LANA e TAFURI, 2000).

O ciclo de vida do protozoário *T. cruzi* e as respectivas formas morfológicas celulares estão representados na Figura 2.

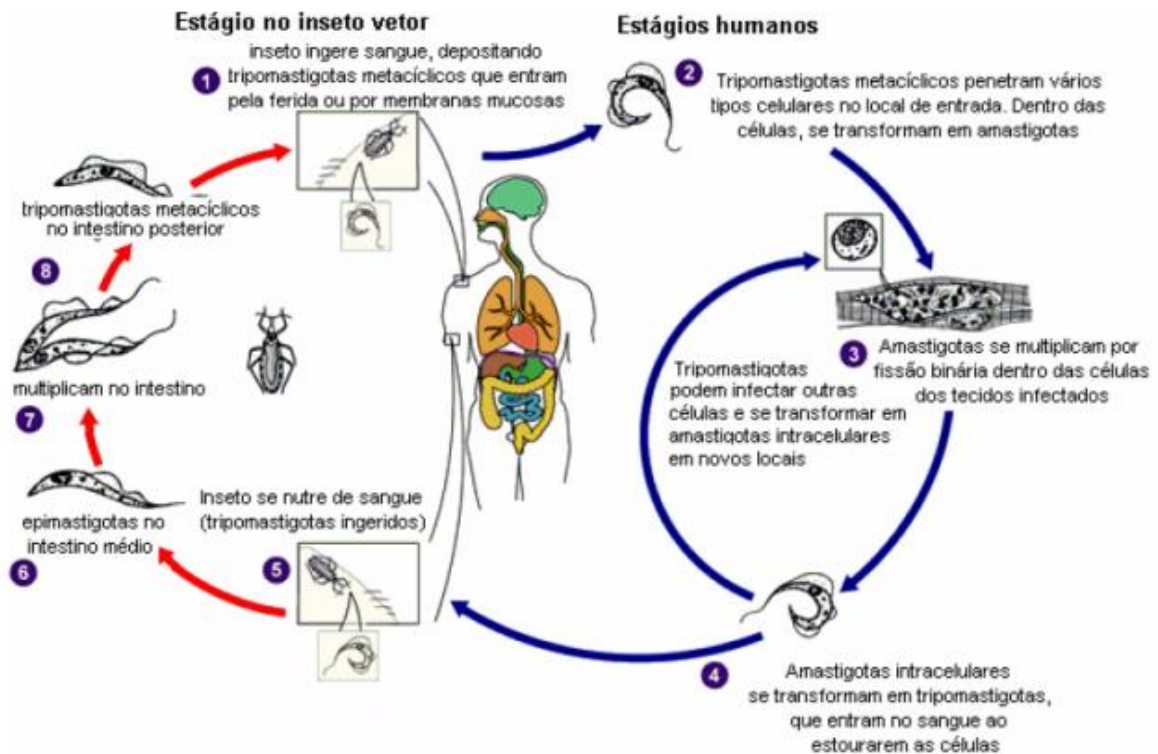


Figura 2 Ciclo de vida de *Trypanosoma cruzi*, causador da doença de Chagas. Fonte: Adaptado de CDC's Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 2019). Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamericana/index.html>> Acesso em 27/01/2020.

O ciclo de vida do *T. cruzi* se inicia quando um inseto vetor triatomíneo infectado, ao se alimentar do sangue do hospedeiro vertebrado, elimina em suas fezes e urina o parasita na forma tripomastigota metacíclica. Estas entram no hospedeiro através da ferida da picada ou de membranas mucosas intactas, como por exemplo, a conjuntiva. Dentro do hospedeiro, as tripomastigotas invadem as células próximas ao local de inoculação, onde se diferenciam em amastigotas intracelulares, capazes de multiplicarem-se por divisão binária (CDC, 2019).

As amastigotas multiplicam-se no interior dos macrófagos e em diversos órgãos, com predominância do baço, fígado, linfonodos, tecido conjuntivo intersticial, miocárdio ou músculo esquelético (COURA, 2003; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, et al., 2016; ROWE et al., 2017). Quando as células estão repletas dessas formas, estas se diferenciam em tripomastigotas, que com a ruptura da célula hospedeira, disseminam-se pela circulação como tripomastigotas de corrente sanguínea. Essas tripomastigotas são capazes de infectar uma variedade de tecidos e órgãos e de se transformarem em amastigotas intracelulares em novos locais de infecção. Se o indivíduo ou animal infectado é picado pelo vetor, as tripomastigotas em seu sangue podem ser

transmitidas ao inseto. No intestino médio do inseto, as tripomastigotas ingeridas se transformam em epimastigotas. As epimastigotas multiplicam-se neste local e diferenciam-se novamente em formas infectantes (tripomastigotas metacíclicas) que são eliminadas junto com as fezes e a urina do vetor, fechando assim o ciclo (COURA, 2003; FIOCRUZ, 2009; SÁNCHEZ-GONZÁLEZ et al., 2016; ROWE et al., 2017; CDC, 2019).

Outras vias menos comuns de transmissão incluem transfusões de sangue, transplante de órgãos, transmissão transplacentária e a transmissão pela via oral (COURA, 2007; 2015; CDC, 2019).

Com o controle da transmissão vetorial da doença de Chagas no Brasil por seu principal vetor, o *Triatoma infestans*, a transmissão oral de *T. cruzi* vem ampliando a sua relevância epidemiológica, em especial nos contextos da Região Amazônica (DIAS, 2016). O mecanismo de transmissão oral de *T. cruzi* se dá principalmente por meio da ingestão das fezes ou urina de triatomíneos ou, ainda, de triatomíneos infectados na hipótese de que sejam processados junto com alimentos ou bebidas (COURA, 2007; 2015; DIAS, 2016).

A doença de Chagas se desenvolve em diferentes estágios (TARLETON, 2011; GRANJON et al., 2016). Pode ser sintomática ou assintomática, sendo que cerca de 90% dos pacientes são assintomáticos (BRENER et al., 2000). Seguida a exposição ao *T. cruzi*, depois da infecção e incubação (que na transmissão vetorial pode ser de 1 a 2 semanas), inicia-se a fase aguda da doença (GRANJON et al., 2016).

A grande maioria dos indivíduos infectados com *T. cruzi* parece controlar, mas não elimina completamente a infecção. Infecções agudas graves podem ocorrer quando o nível de parasitas circulantes no paciente é alto (aparentemente em alguns surtos de infecção oral) ou nos imunossuprimidos (TARLETON, 2011). Nesses casos, miocardite e/ou meningoencefalite são comuns e podem ser letais. Caso contrário, os sintomas do estágio agudo são geralmente raros ou benignos (por exemplo, febre, glândulas linfáticas inchadas, cefaleia e artralgia) (TARLETON, 2011; GRANJON et al., 2016). No local da picada do inseto, ocasionalmente pode ocorrer uma reação inflamatória à penetração do parasita, com edema cutâneo ou de mucosa, conhecido como “chagoma de inoculação”, que são lesões furunculóides, não supurativas, em membros, tronco e face, que quando ocorrem nos olhos, denominam-se “sinal de Romana” (conjuntivite unilateral) (COURA, 2003; TARLETON, 2011; COURA, 2015; GRANJON et al., 2016).

A transição para uma infecção crônica relativamente assintomática (também chamada de “fase indeterminada”) é marcada pela geração de um poderoso controle imunológico da infecção e uma conseqüente diminuição dos níveis de parasitas. Os parasitas não apenas se tornam menos abundantes em face das respostas imunes em desenvolvimento, como também se limitam a apenas certos tecidos do hospedeiro (músculo, gordura e sistema nervoso) - não por conseqüência, também aos locais de eventual doença (TARLETON, 2011).

Cerca de 70% dos pacientes crônicos têm a forma indeterminada da doença de Chagas e nunca desenvolverão complicações clínicas graves (RASSI, A. J.; RASSI, A.; MARIN-NETO, 2010). No entanto, cerca de 30% poderão evoluir para uma de suas três principais formas: forma cardíaca, com miocardite crônica, insuficiência cardíaca e eventualmente morte súbita por arritmia cardíaca; forma digestiva, com megaesôfago e megacólon; ou forma mista, com cardiopatia e "megas" simultaneamente; estes, após um período de latência variando de 10 a 30 anos, dispõem de risco de vida (COURA, 2003; GRANJON et al., 2016).

A cardiopatia chagásica crônica é a forma clínica sintomática mais corriqueira da doença de Chagas. Ocorre em aproximadamente 20 a 40% das pessoas infectadas e é uma condição potencialmente letal (FERREIRA et al., 2016). As lesões cardíacas são primariamente inflamatórias e secundariamente degenerativas (DIAS et al., 2016).

O sistema imunológico inato parece ter um papel fundamental em pelo menos dois aspectos importantes da doença de Chagas: no controle da replicação parasitária e na disseminação nos tecidos do hospedeiro; e no processo inflamatório nos tecidos hospedeiros infectados, que é uma das principais causas de dano tecidual e disfunção orgânica (JUNQUEIRA et al., 2010).

Quando a forma amastigota está nas células dos tecidos, multiplica-se, formando pseudocistos que se rompem, levando a uma reação inflamatória, necrose, destruição neuronal e fibrose. Os antígenos liberados pelo parasita ligam-se à superfície das células vizinhas, que se tornam alvos de resposta imune celular e humoral. Toda vez que o ciclo se reinicia, perpetua-se o processo, provavelmente por um mecanismo autoimune com a participação do parasita ou seus antígenos (COURA, 2003).

Assim, após intensa replicação nos tecidos do hospedeiro vertebrado na fase aguda, as diversas moléculas expressas pelas formas tripomastigotas e amastigotas induzem a produção de citocinas pró-inflamatórias como interferon- γ (IFN- γ), Interleucina 12 (IL-12) e o fator de necrose tumoral- α (TNF α) que, quando produzidas

em níveis adequados, estão associadas a um fenótipo de resistência (ANTUNES e CARDONI, 2000; LOURDES, 2013).

Durante a resposta imune adaptativa na doença de Chagas, a ativação de células B levando à produção de níveis substanciais de anticorpos e a ativação adequada de linfócitos T CD4+ e CD8+ são essenciais para a diminuição de parasitemia na fase aguda e controle da infecção na fase crônica (ROTTENBERG et al., 1993, GAZZINELLI e DENKERS, 2006; LOURDES, 2013).

Na fase crônica, a patogenia da doença de Chagas é mais complexa. Há duas teorias: a primeira atribui a miocardiopatia chagásica crônica a múltiplos fatores, como: imunodepressão, fibrose e dilatação da microvasculatura associadas a uma resposta inadequada do hospedeiro; a segunda, alternativamente, corresponde ao modelo histotrópico-clonal, o qual procura relacionar a variabilidade genética do *T. cruzi* com a patogenia da doença (COURA, 2003).

No Brasil, estima-se que havia de 2 a 3 milhões de indivíduos infectados em 2013, dos quais 600.000 apresentavam complicações cardíacas e/ou gastrointestinais. A doença é responsável por aproximadamente 6.000 óbitos por ano no território brasileiro, ou seja, 0,6% de todas as mortes ocorridas no país (BARROS e MARKMAN, 2014; MARTINS-MELO, 2014).

O tratamento da doença de Chagas tem como objetivo, além de eliminar a infecção, prevenir lesões em órgãos importantes, como coração, fígado e estômago (COURA et al., 1997). Apesar da gravidade das condições clínicas, existem apenas dois medicamentos certificados para tratamento: nifurtimox e benznidazol. Essas substâncias apresentam ação efetiva apenas em pacientes na fase aguda da doença. No entanto, essa fase geralmente apresenta sintomas inespecíficos e a maioria dos pacientes só procura assistência médica quando a infecção é crônica, com efeitos irreversíveis nos órgãos afetados (MARIN-NETO; SIMÕES; SARABANDA, 1999).

A eficácia desses medicamentos pode variar de acordo com a área geográfica do paciente, provavelmente em consequência da suscetibilidade de diversas cepas de *T. cruzi* ao fármaco empregado (DIAS e COURA, 1997).

O uso de nifurtimox e benznidazol no tratamento da fase crônica é questionável, pois além de efeitos adversos intensos, ambos apresentam baixa eficácia terapêutica (CASTRO; MECA; BARTEL, 2006; MORILLO et al., 2015). O uso de nifurtimox frequentemente causa anorexia, perda de peso, alterações psíquicas, excitabilidade, sonolência e complicações digestivas como náusea, vômito, cólicas intestinais e diarreia. No tratamento com benznidazol, as reações adversas mais evidentes são as

cutâneas, como hipersensibilidade, dermatite com erupções, edema generalizado, febre, linfadenopatia, dor articular e muscular (CASTRO; MECA; BARTEL, 2006).

Diante disso, o desenvolvimento de novos fármacos contra o *T. cruzi* é fundamental. Há muito tempo, as plantas medicinais são utilizadas no tratamento de doenças parasitárias pela medicina popular e muitos trabalhos corroboram a importância terapêutica de produtos naturais na tripanossomíase americana (BEZERRA et al., 2012). Compostos bioativos de origem natural, como por exemplo, as quinonas, os flavonoides, alcaloides e terpenos, podem ser ativos contra *T. cruzi* e se apresentam como uma direção promissora na busca de drogas eficazes para prevenção e tratamento da doença de Chagas (GUIMARÃES e FARIA, 2007).

3.3. Leishmanioses

As leishmanioses estão distribuídas mundialmente em regiões tropicais e subtropicais, com a capacidade de se adaptarem a diferentes ecossistemas e acometerem diferentes espécies de mamíferos como roedores, caninos, marsupiais, edentados, carnívoros, primatas e entre estes, humanos. (WHO, 2017; ANVERSA et al., 2018).

São antroponozoonoses (BRASIL, 2017) causadas por várias espécies de protozoários digenéticos da ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (ANVERSA et al., 2018), capazes de afetar a pele, mucosas e órgãos internos, denominadas respectivamente de leishmaniose cutânea (LC), leishmaniose mucocutânea (LMC) e leishmaniose visceral (LV) (VILELA, 2013; WHO, 2017).

Em um estudo que caracteriza os indivíduos afetados por doenças tropicais negligenciadas e sua distribuição espacial, duas das doenças mais prevalentes encontradas foram leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana (que inclui a leishmaniose cutânea e a mucocutânea), respectivamente (ROSÁRIO et al., 2017). Essas doenças são resultantes da combinação da infecção pelo parasita com os mecanismos imunológicos do hospedeiro, o que facilita a existência de diferentes manifestações clínicas, histopatológicas e imunopatológicas (ANVERSA et al., 2018).

A LC é a forma mais comum da doença e exibe várias apresentações clínicas, dependendo das espécies de *Leishmania*, imunidade do hospedeiro e transmissão (CARIDHA, 2019). Geralmente causa lesões desfigurantes, principalmente em partes do corpo que são normalmente expostas, como face, braços e pernas. Pode haver grande número de lesões, às vezes até 200, que podem causar sérias deficiências. Quando as úlceras cicatrizam, elas invariavelmente deixam cicatrizes permanentes,

que muitas vezes são causa de preconceitos sociais. Assim, as pessoas afetadas são estigmatizadas e têm acesso prejudicado à educação e empregos bem remunerados, o que leva a perdas econômicas e danos psicológicos (WHO, 2017).

Todas as espécies são capazes de produzir as múltiplas lesões, que tendem a cicatrizar lentamente, deixando marcas desfigurantes. Nos países do Velho Mundo (Europa e Oriente Médio), a LC é causada principalmente por *L. major*, *L. aethiopica* (transmissão zoonótica) e *L. tropica* (transmissão antroponótica). A *L. aethiopica* também pode metastatizar para regiões oronasais ou através de toda a pele do corpo como LC difusa. A *L. infantum* causa lesões nodulares geralmente simples, que cicatrizam lentamente, mas também podem afetar a região oronasal (CARIDHA, 2019).

Nos países do Novo Mundo (Américas), as lesões primárias podem ser únicas ou múltiplas, mas a linfadenite e a linfadenopatia são comuns às lesões causadas por espécies do subgênero *Viannia*. Além disso, lesões cutâneas e mucosas secundárias podem ocorrer. Os parasitas se espalham para as membranas mucosas, especialmente as do nariz, boca e garganta, e podem causar danos extensivos e desfiguração, dando origem à leishmaniose mucocutânea (LMC). Esta condição é causada principalmente por *L. braziliensis* e *L. panamensis/guyanensis* (todas as espécies do subgênero *Viannia*), embora possa resultar da infecção por outras espécies (BRASIL, 2017; CARIDHA, 2019).

A leishmaniose disseminada (LD) é outra manifestação clínica mais associada a infecções por *L. braziliensis*, caracterizada pelo desenvolvimento de muitas lesões poligóricas tegumentares em várias áreas do corpo. Os parasitas estão presentes em pequeno número nas lesões, com sinais de uma forte resposta inflamatória (MACHADO, G. U.; PRATES; MACHADO, P. R. L., 2019). No Novo Mundo, outra forma rara, mas grave, de doença tegumentar é a leishmaniose cutânea difusa (LCD), associada principalmente a infecções por *L. amazonensis*. A LCD é caracterizada por múltiplas placas e nódulos infiltrados e ausência de úlceras ou envolvimento da mucosa e, também, pela proliferação descontrolada de parasitas em macrófagos e pela ausência de infiltração imune nas lesões (BRASIL, 2017; CARIDHA, 2019).

A LV, também conhecida como calazar, é uma doença sistêmica crônica que afeta principalmente os gânglios linfáticos, o baço, o fígado e a medula óssea e, menos comumente, os rins, as placas de Peyer no intestino, os pulmões e a pele (ANVERSA et al., 2018). O período de incubação da doença varia de 10 dias a 24 meses (com média entre 2 e 6 meses). É caracterizada, principalmente, por episódios

irregulares de febre, perda de peso substancial, hepatomegalia, esplenomegalia, palidez cutâneo/mucosa e diarreia. Frequentemente, exames complementares mostram diferentes graus de anemia, trombocitopenia e leucopenia, com predomínio marcante de células linfomonocíticas, hipoalbuminemia e hipergamaglobulinemia (KURSUN et al., 2013; BRASIL, 2014). Se a doença não for tratada, a taxa de mortalidade nos países em desenvolvimento pode chegar a 100% em 2 anos (ANVERSA et al., 2018).

Os vetores são as fêmeas dos insetos que têm de 2 a 3 mm de comprimento (WHO, 2017), chamados flebotomíneos, pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e *Lutzomyia*, no Novo Mundo. Aproximadamente 700 espécies de flebotomíneos foram descritas, das quais cerca de 30 espécies são vetores comprovados de leishmaniose e mais de 40 espécies adicionais são vetores suspeitos (ANVERSA et al., 2018).

Os protozoários do gênero *Leishmania* pertencem à família Trypanosomatidae, e são parasitas intracelulares obrigatórios das células do sistema fagocítico mononuclear. A *Leishmania* apresenta duas formas morfológicas principais durante seu ciclo de vida: promastigota, encontrada no tubo digestivo do inseto vetor, e amastigota, observada nos tecidos dos hospedeiros vertebrados (Figura 3) (BRASIL, 2017; ANVERSA et al., 2018).

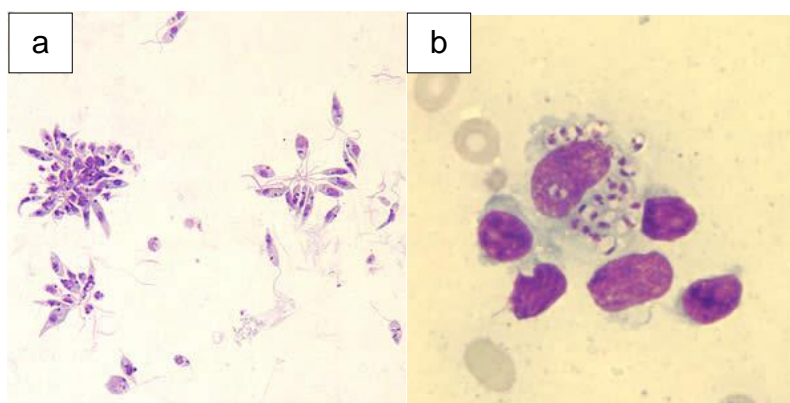


Figura 3 Formas morfológicas de *Leishmania* sp. a) Promastigotas de cultura de *Leishmania* sp.; b) Amastigotas de *Leishmania* sp. em raspagem de tecido corado com Giemsa. Fonte: CDC's Division of Parasitic Diseases. Disponível em: Image gallery <<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>> Acesso em 27/01/2020.

O ciclo de vida e a transmissão por parasitas de *Leishmania* spp. ocorrem quando a fêmea do flebotomíneo infectado, conhecido como mosquito palha, inocula as formas promastigotas metacíclicas, juntamente com a saliva, durante a hematofagia. (figura 4). Uma vez dentro do hospedeiro vertebrado, estas formas são

fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear do hospedeiro vertebrado e, no seu interior, se diferenciam em formas amastigotas que se multiplicam por divisão binária (ANVERSA et al., 2018).

As formas amastigotas imóveis são esféricas ou ovais e medem cerca de 2,5-5,0 μm de diâmetro. Elas têm um cinetoplasto localizado próximo ao núcleo. As formas amastigotas são liberadas pela ruptura dos macrófagos, sendo capazes de infectar novos macrófagos. Assim, as fêmeas de flebotomíneos são infectadas durante a alimentação do sangue em um hospedeiro vertebrado pela ingestão de sangue e/ou macrófagos contendo linfa intersticial possuindo macrófagos parasitados por formas amastigotas de *Leishmania*. (KUMAR e ENGWERDA, 2014; ANVERSA et al., 2018).

No trato digestivo do inseto, os amastigotas se diferenciam em promastigotas, que são formas alongadas, flageladas, móveis, com cerca de 5-15 μm de comprimento e com cinetoplastos localizados entre o núcleo e a extremidade anterior. Ainda no trato digestivo do vetor, as formas promastigotas passam por vários estágios - pró-cíclico, nectomonato, leptomonato, haptomonato - até se tornarem promastigotas metacíclicas, que são infecciosas para o hospedeiro vertebrado (ANVERSA et al., 2018).

Altamente adaptadas para uma transmissão bem-sucedida, as promastigotas metacíclicas migram para o aparelho bucal do inseto (probóscide). Consequentemente, essa forma infectante é inoculada durante a nova hematofagia e o ciclo recomeça (ANVERSA et al., 2018).

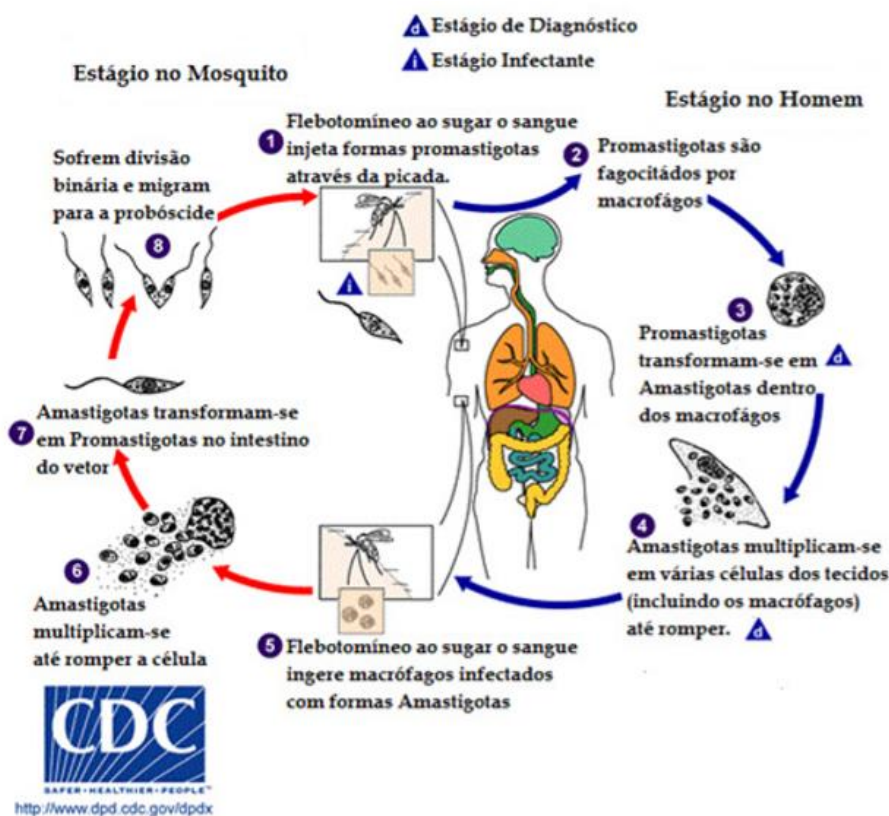


Figura 4 Ciclo de vida dos parasitas do gênero *Leishmania*, causador da doença leishmaniose. Adaptado de CDC's Centers for Disease Control and Prevention (CDC, 2019). Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/leishmaniasis/index.html>> Acesso em 27/01/2020.

Diversos mecanismos de adaptação foram desenvolvidos pelo gênero *Leishmania*, não só para a sobrevivência nas condições digestivas agressivas encontradas nos flebotomíneos, como também a fim de garantir sua sobrevivência e replicação dentro dos macrófagos (ANVERSA et al., 2018). Na corrente sanguínea do hospedeiro vertebrado, antes de infectar os macrófagos, a primeira barreira do sistema imunológico encontrada pelos parasitas após a transmissão é o sistema do complemento. Moléculas presentes na superfície das formas promastigotas metacíclicas, como lipofosfoglicano (LPG) e metaloprotease gp63, conferem resistência à lise mediada pelo complemento (ANVERSA et al., 2018).

Após o reconhecimento dos parasitas, os macrófagos são ativados e podem fagocitá-los e destruí-los através da geração de explosão oxidativa e produção de óxido nítrico (ASSCHE et al., 2011; CARNEIRO, 2016; NASCIMENTO et al., 2017), embora os mecanismos de escape dos parasitas sejam difíceis de superar. Infecção por *Leishmania spp.* induz a produção de certas citocinas pelas células infectadas e inibe outras a modularem o recrutamento celular local e a diferenciação celular para facilitar a reprodução do parasito (LEAL et al., 2014; CASTELLANO et al., 2015).

Assim, o painel de citocinas e quimiocinas envolvidas e suas vias de sinalização determinam a resposta imune e a evolução das lesões (NASCIMENTO et al., 2017).

Depois de escapar do ambiente extracelular, os parasitas penetram nas células fagocíticas através de interações entre suas moléculas superficiais e receptores dos macrófagos. Esses receptores são descritos como facilitadores da internalização das formas promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania* e, dentre eles, estão os receptores CR1, CR3, manose-fucose, fibronectina e CR4 (ANVERSA et al., 2018).

Após a ligação à superfície celular dos macrófagos, as formas promastigotas do parasita são endocitadas em um fagolisossomo. Ao contrário das formas amastigotas, as formas promastigotas são vulneráveis à degradação ácida e hidrolítica do fagolisossomo. Assim, o primeiro mecanismo de defesa do parasita no interior dos macrófagos consiste no retardo na formação do fagolisossomo, com este processo dependente das moléculas de superfície do LPG, da presença de cálcio e da inibição da proteína quinase C (PKC) (TEJLE; MAGNUSSON; RASMUSSEN, 2002; HOLM et al., 2003).

Uma vez formado o fagolisossomo, as promastigotas tornam-se amastigotas, mais resistentes à atividade microbida dos macrófagos, uma vez que podem inibir as enzimas hidrolíticas, a produção de óxido nítrico e também os metabólitos da explosão oxidativa (ALEXANDER; SATOSKAR; RUSSELL, 1999).

A inibição da produção das citocinas envolvidas na resposta pró-inflamatória, que envolve a interleucina-1, fator de necrose tumoral alfa e interleucina-6 (IL-1, TNF- α e IL-6, respectivamente), e da ativação de linfócitos T; a indução de moléculas imunossupressoras, como prostaglandina E₂ (PGE₂), fator de crescimento transformador beta (TGF- β) e interleucina-10 (IL-10), estão dentre as estratégias desenvolvidas pela *Leishmania* para escapar da defesa imunológica do hospedeiro (CUNNINGHA, 2002; KIMA, 2007).

Tal como acontece com outras doenças infecciosas e parasitárias, numerosos estudos em modelos experimentais estabelecem um “paradigma Th1/Th2” na leishmaniose, em que a resistência à doença é conferida por uma resposta Th1 com níveis elevados de interferon-gama (IFN- γ), interleucina-12 (IL-12), interleucina-2 (IL-2) e TNF- α . Isso estimula a função microbida dos macrófagos e promove a morte de parasitas intracelulares, enquanto a suscetibilidade está ligada a uma resposta do tipo Th2, com um aumento na produção de interleucinas 4, 5, 10 e 13 (IL-4, IL-5, IL-10 e IL-13), inibindo a ativação de macrófagos e contribuindo para o crescimento do parasita nas lesões (SHARMA e SINGH, 2009).

Entretanto, a resistência ou suscetibilidade a doenças em humanos não é explicada exclusivamente pelo padrão de resposta Th1 ou Th2 e a resposta imune pode ser fortemente influenciada por fatores como desnutrição, imunidade, supressão (por exemplo, a Síndrome da Imunodeficiência Adquirida – SIDA) e, inevitavelmente, os componentes genéticos do hospedeiro. (ANVERSA et al., 2018).

A L-arginina tem sido descrita como um aminoácido essencial para a sobrevivência e infectividade da *Leishmania* (MUXEL et al., 2017). Ela é convertida pela arginase em ureia e ornitina, fornecendo o substrato para a produção de poliamina (ROBERTS et al., 2004). Foi demonstrado que a ausência de arginase prejudica o crescimento do parasita, revelando um papel central para a arginase no destino da infecção durante a interação parasita-hospedeiro (DA SILVA et al., 2012).

Com elevada incidência e ampla distribuição geográfica nas Américas, as leishmanioses continuam sendo um desafio para os programas nacional e regional, que requerem um grande esforço técnico, operativo e político para manterem o desenvolvimento sistemático de ações de vigilância, prevenção e controle destas doenças. Além disso, estas doenças são exemplos de DTNs em que se observa uma limitada disponibilidade de medicamentos (BATISTA, 2014; BRASIL, 2017; PAHO/WHO, 2018).

O sucesso do tratamento envolve vários fatores, tais como: (1) fatores do hospedeiro, como genética, resposta imune e apresentação clínica da doença; (2) recursos de tratamento, tais como qualidade da droga, dosagem, duração e conclusão da terapia; e (3) características do parasita, como sensibilidade intrínseca da espécie e falta de resistência ao medicamento (SUNDAR & SINGH, 2016).

O fármaco de primeira escolha para o tratamento de leishmaniose no Brasil é o antimoniato de metilglucamina, comercializado como Glucantime®. Contudo, a sua estrutura, composição e o mecanismo de ação ainda são pouco conhecidos (RATH et al., 2003; BRASIL, 2014). Além disso, sua utilização é questionável em razão de sua toxicidade, graus de resistência ao parasita, tempo de tratamento, custo elevado e forma de administração, que ocorre apenas via parenteral. Em alguns casos, as drogas de segunda escolha são Anfotericina B e Pentamidina, que também apresentam efeitos colaterais e toxicidade para o hospedeiro (CROFT, 2001; VILELA, 2018).

Por conta disso, há diversos estudos com produtos de origem vegetal (SANTIN, M.R., et al., 2009) na tentativa de reverter a realidade no tratamento da leishmaniose. Isso é possível devido à presença de uma variedade de compostos com bioatividade

nas plantas, como alcaloides e flavonoides, que apresentam ampla ação antiparasitária, antimicrobiana, analgésica, antifúngica e antioxidante (YAYLI et al., 2005).

Nesse sentido, a pesquisa por novas drogas antiparasitárias contra diferentes formas de leishmaniose, com menor toxicidade para o usuário, principalmente com custo razoável, continua sendo uma prioridade clínica e é fundamental, sobretudo a se considerar como fonte para essa busca a grande biodiversidade de espécies vegetais brasileiras (RATES, 2001; ANVERSA et al., 2018).

3.4. Ativação de macrófagos

Os macrófagos têm a habilidade de reconhecer, fagocitar e eliminar alguns patógenos e, portanto, exercem papel fundamental na resposta imunológica do hospedeiro. A formação dos macrófagos ocorre sequencialmente através dos monoblastos e promonócitos residentes na medula óssea e, posteriormente segue para os monócitos em sangue periférico, que por fim, originam os macrófagos teciduais inflamatórios (MOSSER & EDWARDS, 2008; DAVIES et al., 2013).

A resposta imune é iniciada através dos macrófagos pelo reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs, do inglês *Pathogen Associated Molecular Pattern*) (KOPP & MEDZHITOV, 2003) que se ligam a receptores de reconhecimento de padrões (do inglês *Pattern Recognition Receptors* ou PRRs), induzindo respostas específicas. A ativação do macrófago e sua participação no sistema imune inato acontecem principalmente pelo receptor do tipo *Toll* (TLR), onde se inicia uma série de eventos intracelulares envolvendo proteínas e fatores de transcrição de inúmeros genes que codificam a produção de diferentes mediadores (KAWASAKI e KAWAI, 2014).

O processo de ativação dos macrófagos é caracterizado por um rápido aumento no metabolismo, motilidade e atividade fagocítica. (MOSSER e EDWARDS, 2008; LLOBERAS; MODOLELL; CELADA, 2017). A fagocitose de antígenos particulados ou o contato com receptores que detectam moléculas presentes nos patógenos microbianos em geral atuam como ativador inicial. Entretanto, a atividade dos macrófagos pode ser posteriormente aumentada pelas citocinas secretadas pelas células T *helper* ativadas e pelos mediadores da resposta inflamatória. Isto é, em relação à eliminação de um patógeno em potencial, os macrófagos ativados são mais eficazes do que os macrófagos em repouso. Ativados, eles têm um aumento na sua atividade fagocítica, uma capacidade maior de matar os micróbios ingeridos, têm sua

secreção aumentada de mediadores da inflamação e uma capacidade aumentada para ativar as células T (ROSSOL et al., 2011).

Durante as duas fases da inflamação, os macrófagos exercem dois papéis opostos que contribuem para a destruição do tecido ou para o reparo tecidual. Por um lado, eles mostram atividade pró-inflamatória (tipo M1), com propriedades microbicidas, que ocorre como resultado da ativação clássica. Por outro lado, para exercer funções de reparo tecidual, alternativamente ativados, realizam atividade anti-inflamatória/regulatória (tipo M2), que está relacionada à resolução da inflamação. (LLOBERAS; MODOLELL; CELADA, 2017; TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018).

No estágio inicial da doença de Chagas, os macrófagos induzem uma cascata de citocinas: inicialmente produzem IL-12, que é importante principalmente no controle inicial da infecção (ANTUNES e CARDONI, 2000) e que atuam nas células NK para induzir a síntese de INF- γ , o que, por sua vez, aumenta a produção de IL-12, TNF- α e NO nos macrófagos, contribuindo para a morte do parasita. Essa resposta inflamatória inicial leva à polarização do M1 (BRENER e GAZZINELLI, 1997; CAMARGO et al., 1997; ZANLUQUI et al., 2015). Ao mesmo tempo, macrófagos e células NK sintetizam citocinas reguladoras como IL-10 e IL-4 para reduzir os efeitos nocivos associados à estimulação excessiva do sistema imunológico (SATHLER-AVELAR et al., 2009; ZANLUQUI et al., 2015). A IL-4, associada à IL-10, modula a produção de IFN- γ e fornece resistência contra a infecção por *T. cruzi* (ABRAHAMSOHN; da SILVA; COFFMAN, 2000; ZANLUQUI et al., 2015). Essa nova mudança ambiental leva à polarização M2. Assim, a infecção por *T. cruzi* estimula a ativação de macrófagos do tipo M1 e M2 durante as fases iniciais (ZANLUQUI et al., 2015).

In vitro, os macrófagos podem ser ativados por citocinas do tipo T helper (Th) 1, como IFN- γ , e produtos bacterianos, como o lipopolissacarídeo (LPS), para se tornarem pró-inflamatórios. Estas células subsequentemente expressam moléculas altamente destrutivas, tais como espécies reativas de oxigênio (EROs), óxido nítrico (NO), radicais livres de oxigênio e enzimas proteolíticas (LAWRENCE e NATOLI, 2011). Embora todos esses produtos sirvam para destruir microrganismos, eles também são tóxicos para os macrófagos e podem induzir a apoptose (LLOBERAS; MODOLELL; CELADA, 2017).

Nos mamíferos, o NO pode ser produzido por três diferentes isoformas da enzima óxido nítrico sintase, do inglês nitric oxide synthase (NOS), a partir de L-arginina como substrato. As isozimas são referidas como neuronal (nNOS ou NOS I),

induzível (iNOS ou NOS II) e endotelial (eNOS ou NOS III) (FORSTERMANN e SESSA, 2011). A iNOS geralmente não é expressa nas células, mas sua expressão pode ser estimulada em praticamente qualquer célula ou tecido por lipopolissacarídeo bacteriano, citocinas e outros agentes. Quando é induzida em macrófagos, a iNOS produz grandes quantidades de NO, que representa um dos principais princípios citotóxicos dessas células (NATHAN e HIBBS, 1991; FORSTERMANN e SESSA, 2011).

O mecanismo pelo qual a L-arginina é processada durante as fases pró e anti-inflamatória é característico da ativação de macrófagos. IFN- γ e/ou LPS induzem a iNOS, que cataboliza a L-arginina em OH-arginina e depois em NO. Por outro lado, quando os macrófagos são ativados por IL-4, IL-10 ou IL-13 para se tornarem anti-inflamatórios, a arginase 1 é produzida (VAN DEN BOSSCHE, J., et al., 2012). Esta enzima cataboliza a L-arginina em ureia e ornitina, que são então metabolizadas em prolina e poliaminas (putrescina, espermidina e espermina). As poliaminas induzem a proliferação celular e a prolina é necessária para a produção de colágeno (LLOBERAS; MODOLELL; CELADA, 2017).

Portanto, durante a fase anti-inflamatória, os macrófagos catalisam a reconstrução dos tecidos danificados, desencadeando a proliferação celular e a reconstrução da matriz extracelular, esta última ocorrendo durante as fases finais da inflamação. Enquanto a destruição tecidual está associada à produção de NO, a reparação tecidual é caracterizada pela produção de poliaminas e prolina (LLOBERAS; MODOLELL; CELADA, 2017).

Existe uma forte correlação entre L-arginina, macrófagos e doenças parasitárias, dependendo de como a L-arginina é catabolizada pelos macrófagos. Os produtos dessas células podem destruir parasitas (NO) ou, alternativamente, induzir seu crescimento (poliaminas). No caso dos parasitas, a captação maciça de L-arginina pelos macrófagos produz uma depleção de L-arginina no microambiente, afetando a proliferação e a função das células T (LLOBERAS; MODOLELL; CELADA, 2017).

Os macrófagos são as células hospedeiras finais para a proliferação de parasitas de *Leishmania* e essas células são a chave para uma resposta controlada ou exacerbada que culmina nas manifestações clínicas das leishmanioses. Sugere-se que um equilíbrio entre a resposta microbicida inicial (M1) seguida por uma resposta restaurativa (M2) em períodos posteriores proporcionaria o maior benefício para o hospedeiro. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar

completamente o equilíbrio entre estas duas populações principais de macrófagos no controle da infecção por *Leishmania* (TOMIOTTO-PELLISSIER et al., 2018).

O controle das infecções por *T. cruzi* é criticamente dependente da ativação de macrófagos mediada por citocinas, levando à morte intracelular do parasita. A polarização M1 está intimamente ligada à eliminação de parasitas e a polarização M2 pode ser eficaz na prevenção da progressão da patologia oxidativa e inflamatória na doença de Chagas (ZANLUQUI, et al., 2015).

Todos os eventos acima citados, entre outros que envolvam os macrófagos e o sistema imune, necessitam de regulação, assim como outros sistemas biológicos. Quando a resposta imune é iniciada, mecanismos devem existir para controlar a extensão dos seus efeitos e regulá-la de tempos em tempos. Dentre os agentes terapêuticos capazes de alterar as respostas imunológicas, estão os imunomoduladores. Parte dessa ação pode ocorrer devido ao efeito direto sobre as células imunológicas, que pode ser avaliado através de testes *in vitro* adequados para medir a supressão ou a estimulação dos sistemas celulares testados (LU et al., 2004).

3.5. *Lonchocarpus cultratus*

O gênero *Lonchocarpus* pertence à família Fabaceae, à subfamília Leguminosae, à subfamília Papilionoideae, e compreende mais de 100 espécies distribuídas na América tropical, na África, nas ilhas do Caribe, Madagascar e Austrália (MAGALHÃES et al., 1996). No Brasil, foram identificadas 24 espécies nativas (MAGALHÃES et al., 2000).

Diferentes espécies de *Lonchocarpus* demonstraram a presença de flavonoides, chalconas, pterocarpanos, derivados de dibenzoilmetano e rotenóides em estudos fitoquímicos realizados anteriormente (MAGALHÃES et al., 1997; 2000; BORGES-ARGÁEZ; PEÑA-RODRIGUEZ; WATERMAN, 2002; LAWSON; KAOUADJI; CHULIA, 2010).

Um exemplo de espécie de *Lonchocarpus* que sintetiza flavonoides é a *Lonchocarpus xuul*, um tipo de árvore endêmica da Península de Yucatán, no México. A publicação de Monache et al. (1978) identificou nas sementes da planta três chalconas: lonchocarpina, derricina e 4- hidroxilonchocarpina. As cascas do caule também foram estudadas e nelas foram identificados diversos flavonoides (BORGES-ARGÁEZ; PEÑA-RODRÍGRUES; WATERMAN, 2000).

Borges-Argaéz et al. (2007) isolaram da raiz de *L. xuul* a isocordoína, um tipo de chalcona com atividade leishmanicida. Estudos posteriores com a isocordoína

mostraram atividade contra epimastigotas de *T. cruzi* (BORGES-ARGÁEZ et al., 2009). O mesmo grupo de pesquisa também isolou das raízes dessa planta a 4',5-dimetoxi-(6,7:2",3")-6",6"- dimetilpiranoflavona e a lonchocarpina, avaliando e comprovando a atividade anti-*T. cruzi* de ambas as substâncias (BORGES-ARGÁEZ et al., 2009). Um potente efeito anti-*Leishmania* também foi verificado em estilbenos isolados do extrato metanólico das folhas e caule de *Lonchocarpus nicou*, planta nativamente peruana conhecida popularmente como "barbasco". (FUCHINO et al., 2013).

O efeito anti-inflamatório da lectina de sementes de *Lonchocarpus araripensis* foi demonstrado em camundongos (PIRES et al., 2016) e em modelos de ratos com inflamação aguda (PIRES, 2019), indicando potencial papel modulador da planta em eventos inflamatórios celulares.

Na espécie *Lonchocarpus chiricanus*, uma classe de árvore nativa do Panamá, as propriedades do extrato diclorometânico das cascas das raízes foram estudadas frente à *Cladosporium cucumerinum*, uma espécie de fungo fitopatogênico, e contra as larvas do mosquito *Aedes aegypti*. Em ambos os testes, foram observados resultados satisfatórios, revelando o potencial farmacológico da planta (IOSET et al., 2001).

A espécie *Lonchocarpus cultratus* (Vell.) A.M.G. Azevedo & H.C. Lima é uma espécie arbórea nativa que pertence à família Fabaceae e, por ter problemas de taxonomia, apresenta grande variedade de sinonímias, como: *Pterocarpus cultratus*, *Neuroscapha guilleminiana*, *Lonchocarpus neuroscapha*, *Lonchocarpus guilleminianus*, *Derris guilleminiana*, *Neuroscapha pubigera* e *Neuroscapha martiana* (SILVA & TOZZI, 2012). Sua classificação botânica está apresentada na Tabela 1:

Tabela 1 Classificação botânica de *L. cultratus*.

Classificação	<i>Lonchocarpus cultratus</i>
Reino	Plantae
Sub-reino	Tracheobionta
Superdivisão	Spermatophyta
Divisão	Magnoliophyta (Angiospermae)
Classe	Spermatophyta
Subclasse	Rosidae (Eurosídeas I)
Ordem	Fabales
Família	Fabaceae
Subfamília	Faboideae/Papilionoideae
Gênero	<i>Lonchocarpus</i>
Espécie	<i>Lonchocarpus cultratus</i> (Vell.) A.M.G. Azevedo & H.C. Lima.

(SOUZA e LORENZI, 2012).

A planta também é identificada com vários nomes populares, dependendo da região onde é nativa. No Brasil, é conhecida como cabelouro, na Bahia; embira-branca, em São Paulo; embira-d'anta e embira-de-macaco, no Espírito Santo; embira-de-carrapato, em Minas Gerais; embira-de-sapo, nos estados de Minas Gerais, Rio de Janeiro, Santa Catarina, São Paulo e Distrito Federal; imbirade-caboclo, no Paraná; piaca, em Pernambuco; e rabo-de-macaco, em Santa Catarina (SILVA e TOZZI, 2012).

L. cultratus floresce entre dezembro e janeiro e a maturação de seus frutos ocorre durante os meses de maio a agosto. É um tipo de árvore que varia de 4 a 30 m de altura, com tronco de 40–50 cm de diâmetro. A madeira é relativamente pesada, dura, compacta, suscetível a polimento e moderadamente resistente ao ataque de organismos xilófagos. (LORENZI, 2002).

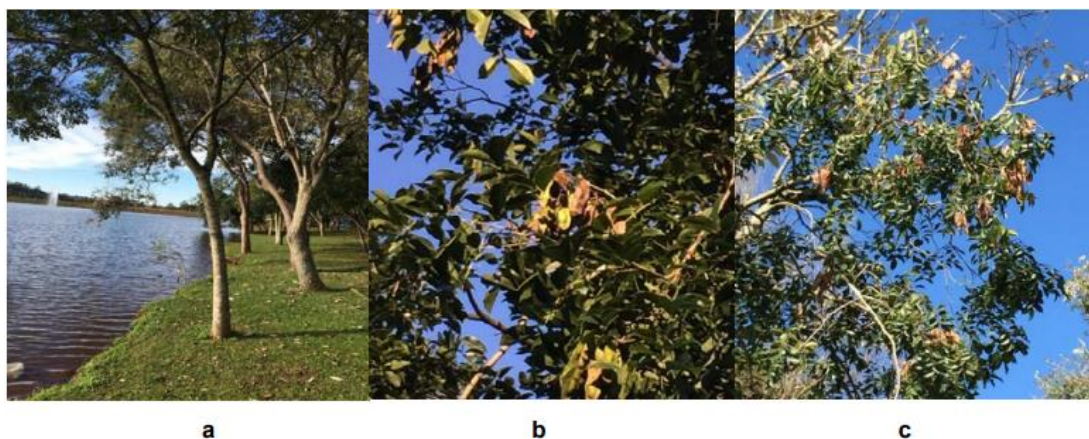


Figura 5 Fotos de *Lonchocarpus cultratus* (a): vista geral da árvore, (b) e (c): galhos, folhas e frutos (GRIEBLER, 2017).

A árvore de *L. cultratus* cresce usualmente em matas ciliares ou em florestas tropicais sazonalmente secas e úmidas. Sua distribuição é restrita à América do Sul, principalmente Bolívia, Brasil, Colômbia, Equador e Peru. No Brasil, é comum em todas as regiões, especialmente no Rio de Janeiro, Minas Gerais, São Paulo e Paraná (LORENZI, 2002).

A caracterização dos metabólitos secundários de *L. cultratus* não foi elucidada, embora alguns de seus constituintes tenham sido identificados. Magalhães et al. (2002) observaram no extrato das raízes alcaloides polihidroxilados e derivados acetilados de 2,5-trans-dihidroximetil-3,4-transdihidroxipirrolidina, 1-deoximannojirimicina, 1-deoxinojirimicina, fagomina e homonojirimicina. Anteriormente, Mello, et al. (1973 e 1974) isolaram nas raízes da planta o triterpeno β -amirina e as chalconas cordoína, derricina e isocordoína, além de misturas de

lonchocarpina, dihidrocordoína, isocordoína, 4-hidroxilonchocarpina, 4-hidroxiderricina, 4-hidroxiisocordoína e 4- hidroxicordoína.

Diversos trabalhos relataram as propriedades biológicas da lonchocarpina, um dos constituintes de *L. cultratus*. A lonchocarpina exibiu efeitos gastroprotetores ao inibir a atividade da H⁺, K⁺ - ATPase (REYES-CHILPA et al., 2006). Também exibiu propriedades anti-inflamatórias e anti-edematogênicas agudas em um modelo de edema de pata (FONTENELE et al., 2009). Além disso, extrato hexânico das hastes de *Deguelia duckeana*, que contém uma mistura de componentes e entre eles, a lonchocarpina, mostrou atividade antibacteriana contra *Staphylococcus aureus* (LIMA et al., 2013). Outro estudo relatou que a lonchocarpina inibiu a produção de óxido nítrico em células microgлияis BV2 estimuladas por lipopolissacarídeos (LI et al., 2015).

Jeong et al. (2017) demonstraram que a lonchocarpina suprimiu a produção de EROs e a morte celular em astrócitos primários tratados com peróxido de hidrogênio (H₂O₂), concluindo que a lonchocarpina exibiu um efeito citoprotetor nos astrócitos, reduzindo o estresse oxidativo e aumentando a expressão de enzimas antioxidantes.

É possível perceber o potencial farmacológico indicado em diversas espécies de *Lonchocarpus sp.* Diante da variedade de metabólitos e de propriedades biológicas apresentadas por essas plantas, considera-se o estudo de *L. cultratus* importante para o desenvolvimento de novos princípios ativos, visto que este espécime representa uma fonte potencial para diversos usos na área farmacêutica, confirmando a etnofarmacologia como uma abordagem importante na busca de novas drogas.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4.1. Obtenção dos extratos e caracterização

As sementes de *L. cultratus* analisadas foram coletadas de um espécime localizado às margens da Lagoa do Parque Municipal de Cascavel-PR, Brasil (S 24.96308° e O 53.43674°), em maio de 2015. O comprovante de espécime foi depositado no Herbário de UNIOESTE (UNOP nº. 1889).

As sementes coletadas foram secas em estufa de ar circulante (<40°C) e moídas em moinho de facas. O material vegetal obtido foi submetido a sucessivas macerações por exaustão em hexano e filtrado e concentrado num evaporador rotativo sob pressão reduzida, produzindo o extrato hexânico (LHS). O resíduo vegetal remanescente após filtração foi submetido à maceração acima, utilizando solvente de diclorometano em vez de hexano, produzindo o extrato diclorometânico (LDS). Posteriormente, o processo foi repetido usando metanol como solvente de extração e obtendo o extrato metanólico (LMS).

Os espectros de ressonância magnética nuclear (RMN) foram obtidos usando os espectrômetros Varian (Mercury Plus, BB 300 MHz) e Bruker (500 MHz) no Departamento de Química da Universidade Estadual de Maringá-PR (UEM), Brasil, usando CDCl_3 como solvente e trimetilsilano (TMS) como referência interna. A caracterização química de cada extrato (LHS, LDS e LMS) foi realizada por RMN de ^1H , comparando os sinais de ^1H com os descritos na literatura.

4.2. Preparo das soluções-mãe

As soluções-mãe dos três extratos foram preparadas na concentração de 40 mg/mL em dimetilsulfóxido (DMSO). A partir dessas soluções-mãe, com até um máximo de 0,6% de DMSO, foram preparadas as concentrações 1, gggnnnnn 10, 15, 50, 100, 150 e 175 $\mu\text{g/mL}$, diluídas em meio de cultura – Roswell Park Memorial Institute (RPMI) Gibco®, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB), 100 $\mu\text{g/mL}$ de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina para a realização dos ensaios.

4.3. Obtenção de macrófagos da cavidade peritoneal de camundongos

Para a obtenção dos macrófagos peritoneais, camundongos Balb/c adultos de aproximadamente 2 meses de idade foram adquiridos do biotério central da Unioeste, e então eutanasiados com Xilazina (60 mg/kg) e Quetamina (270 mg/kg). Todos os experimentos que utilizaram animais foram realizados de acordo com o Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Universidade Estadual do Oeste do Paraná

(UNIOESTE) N° 47/17 (em anexo). Foi realizado o procedimento de exposição do peritônio do animal, seguido de assepsia do local e infusão de 10 mL de solução salina tamponada (do inglês, phosphate buffered saline - PBS) estéril a 4 °C. Posteriormente foi realizada massagem na região peritoneal exposta para a obtenção dos macrófagos. Depois de realizada a massagem, por aproximadamente 1 minuto, o PBS foi retirado com a mesma agulha e seringa de infusão. A suspensão resultante foi transferida para um tubo cônico estéril e centrifugada a 1500 rotações por minuto (rpm) a 4 °C por 6 minutos.

Para a realização dos experimentos nos quais se determinou a viabilidade celular e a produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais frente à diferentes concentrações de extratos de *L. cultratus*, o “pellet” de células obtido após centrifugação foi ressuspenso em 1 mL de meio RPMI Gibco®, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB), 100 µg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina). A partir disso, foi realizada a contagem dos macrófagos em Câmara de Neubauer e ajuste de volume para a concentração de 2×10^5 células por poço. Estas foram, então, distribuídas em placas de 96 e 24 poços e incubadas por 2 horas a 37 °C sob 5% de dióxido de carbono (CO₂).

As células não aderentes foram removidas por lavagem com PBS a 37 °C e, em seguida, foram adicionadas aos poços as concentrações estabelecidas dos extratos de *L. cultratus* diluídos em RPMI. O tempo de incubação do tratamento das células com os extratos foi de 48 horas.

4.4. Determinação da viabilidade celular (citotoxicidade)

Para esta análise foi utilizado o método descrito por Mosmann (1983) com modificações. Os macrófagos peritoneais previamente obtidos foram plaqueados a 2×10^5 células por poço, em placas de 96 poços, que foram incubadas a 37 °C sob 5% de CO₂ por 2 horas para a aderência das células. O sobrenadante (meio de cultura) foi retirado e então adicionado aos poços o tratamento, que consistiu em: as diferentes concentrações dos extratos de *L. cultratus*; somente meio de cultura (RPMI) como controle negativo (CN) e DMSO (diluído em meio RPMI) como controle branco (CB). As células em tratamento ficaram incubadas a 37°C sob 5% de CO₂ por 48 horas. Em seguida os sobrenadantes foram retirados e, então, adicionados 200 µL MTT (brometo de [3-metil-(4-5-48 dimetiltiazol-2-il)-2,5 difeniltetrazólio]) a 5 mg/mL diluídos em EBSS (solução balanceada de Eagle), e a placa foi novamente incubada a 37 °C sob 5% de CO₂ por 3 horas.

Durante o tempo de incubação, formaram-se cristais de formazan, sendo estes visualizados no microscópio antes da retirada dos sobrenadantes dos poços. Os sobrenadantes foram removidos e os cristais de formazan foram dissolvidos em DMSO puro. Aguardaram-se 10 minutos para a total solubilização dos cristais de formazan para a realização da leitura em leitor de microplaca a um comprimento de onda de 550 nm. Os dados foram expressos em porcentagem (%), sendo considerados 100% viáveis os poços que continham somente meio de cultura (RPMI). As diferentes porcentagens de viabilidade obtidas dos compostos possibilitaram determinar a concentração citotóxica dos extratos necessária para causar a morte de 50% das células viáveis (CC₅₀).

4.5. Avaliação do efeito dos compostos na secreção de óxido nítrico

Para esta análise foi utilizado o método descrito por Green et al. (1982) com modificações. Após a aderência dos macrófagos peritoneais, conforme o item 4.3, o sobrenadante (meio de cultura) foi retirado e então adicionado aos poços o tratamento, que consistiu em: as diferentes concentrações dos extratos de *L. cultratus*; somente meio de cultura (RPMI) como controle negativo.

As células em tratamento ficaram incubadas a 37 °C sob 5% de CO₂ por 48 horas. Em seguida, 50 µL dos sobrenadantes foram passados para outra placa de 96 poços para a reação com 50 µL do reagente de Griess [solução 1:1 de naftiletenodiamino 0,1% (p/v) em ácido orto-fosfórico 5% (v/v) e sulfonamina p-aminobenzeno 1% (p/v) em ácido fosfórico 5% (v/v)]. Após 10 minutos para a estabilização da formação do produto (composto azo), foi realizada a leitura em leitor de microplaca a 550 nm.

Lipopolissacarídeo (LPS) a 1 µg/mL, homogeneizado em vortex, foi utilizado como controle positivo (CP) desse ensaio e DMSO (diluído em meio RPMI) como CB. Essa técnica é indireta por detectar a quantidade de nitrito presente na amostra e, indiretamente, a quantidade de NO. Os dados foram expressos em micromolar (µM), através de curva-padrão obtida com concentrações molares conhecidas de NaNO₂ em meio RPMI.

4.6. Avaliação da inibição da liberação de NO pelos extratos em macrófagos peritoneais estimulados pelo lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano

Para esta análise foi utilizado o método descrito por Green et al., 1982, com modificações. Após a aderência dos macrófagos peritoneais, conforme item 4.3, o sobrenadante (meio de cultura) foi retirado e as células foram submetidas ao tratamento com os extratos concomitante ao estímulo por LPS 1 µg/mL. O tratamento consistiu, portanto, nas diferentes concentrações dos extratos de *L. cultratus*; DMSO como controle branco; LPS como controle positivo para a produção de NO e controle negativo do teste, somente RPMI sem a adição de LPS.

As células em tratamento ficaram incubadas a 37 °C sob 5% de CO₂ por 48 horas. Em seguida 100 µL dos sobrenadantes foram passados para outra placa de 96 poços, para a reação com 50 µL do reagente de Griess [solução 1:1 de naftiletilenodiamino 0,1% (p/v) em ácido orto-fosfórico 5% (v/v) e sulfonamina p-aminobenzeno 1% (p/v) em ácido fosfórico 5% (v/v)]. Após 10 minutos para a estabilização da formação do produto (composto azo) foi realizada a leitura em leitor de microplaca a 550 nm.

Os dados foram expressos em micromolar (µM), calculados por regressão linear, utilizando curva-padrão obtida com concentrações molares conhecidas de NaNO₂ em meio RPMI. A partir da concentração em µM, foi possível calcular a porcentagem de inibição através da fórmula (LOPES, 2004):

$$\text{Inibição (\%)} = \left(\frac{A - B}{A - C} \right) * 100$$

Em que A é o resultado do controle LPS, B é o resultado do tratamento testado mais LPS e C é o resultado dos poços que receberam apenas meio RPMI.

4.7. Avaliação da atividade tripanocida dos extratos sobre formas tripomastigotas *in vitro*

A avaliação da atividade tripanocida sobre as formas tripomastigotas seguiu metodologia descrita por Meira et al. (2016) com modificações. Formas tripomastigotas de *T. cruzi* (cepa Y isolada de caso clínico humano) foram obtidas por meio de células da linhagem *Vero* (fibroblastos de rim de macaco verde da África) previamente infectadas com o sangue de camundongos infectados com *T. cruzi*. Estas células foram utilizadas como hospedeiras para a manutenção do ciclo de *T. cruzi in vitro*.

As tripomastigotas foram mantidas em garrafas de cultivo celular (que continham as células *Vero* infectadas) com meio RPMI (suplementado com 10% de

soro fetal bovino (SFB), 100 µg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina). As garrafas de cultivo permaneceram em estufa, a 37 °C sob 5% de CO₂. As tripomastigotas ficam no sobrenadante das garrafas de cultivo e, para a realização dos ensaios, os sobrenadantes das garrafas eram retirados e centrifugados a 4000 rpm por 30 minutos antes da contagem em câmara de Neubauer.

Em placas de 96 poços foram adicionados os parasitas, em uma concentração de 1x10⁵ parasitas por poço e, então, adicionadas as diferentes concentrações dos extratos de *L. cultratus* (1, 10, 15, 50, 100, 150 e 175 µg/mL) diluídos em meio RPMI previamente.

Alíquotas foram retiradas para contagem em câmara de Neubauer nos tempos de 24 e 48 horas após a adição dos extratos. A contagem foi realizada em microscópio óptico para comparação do número de parasitas tratados em diferentes concentrações do extrato em relação ao número de parasitas em contato com meio RPMI (controle negativo). Como controle positivo foi utilizado Benzonidazol (BZN), droga padrão para o tratamento da doença de Chagas, nas mesmas concentrações dos extratos (1, 10, 15, 50, 100, 150 e 175 µg/mL) e DMSO (diluído em meio RPMI) como CB.

Obteve-se os percentuais de inibição a partir das contagens realizadas e, assim, foi possível calcular a concentração letal dos extratos necessária para causar a morte de 50% (CL₅₀) das formas viáveis de tripomastigotas. Posteriormente, foi possível calcular o índice de seletividade através da razão da CC₅₀ obtida no ensaio de citotoxicidade (conforme item 4.4) pelo CL₅₀ de tripomastigotas.

4.8. Avaliação da atividade tripanocida dos extratos sobre formas amastigotas *in vitro*

Para esta análise foi utilizado o método descrito por Meira et al. (2016) com modificações. Formas tripomastigotas de *T. cruzi* foram mantidas em contato com macrófagos peritoneais previamente obtidos (item 4.3) em placas de 24 poços, contendo uma lamínula redonda (13 mm) em cada poço, na proporção de 10 parasitas por macrófago. As placas foram incubadas *overnight* à temperatura de 37 °C sob 5% de CO₂. Após esse tempo de infecção, os parasitas foram retirados, os poços foram lavados com PBS estéril e, depois, os macrófagos foram tratados com os extratos nas diferentes concentrações por 48 horas, sob as condições de 37 °C sob 5% de CO₂.

Após o tempo de tratamento, o sobrenadante das placas foi retirado para posteriores análises e as lamínulas contendo os macrófagos foram fixadas com

metanol por 20 minutos à temperatura ambiente. O fixador foi removido e as lamínulas, lavadas com água destilada; em seguida as células foram coradas com Giemsa (em uma proporção de 3 gotas de Giemsa por mL de água destilada) durante 20 minutos. Após esse período, as lamínulas foram lavadas três vezes com água destilada. Ao final, as lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro e fixadas com *Entellan* para posterior análise em microscópio óptico.

Foram contados em microscópio óptico pelo menos 100 macrófagos por lamínula, sendo estes infectados ou não, para cálculo do índice de internalização. Foram contadas as lamínulas referentes ao tratamento com as diferentes concentrações dos extratos, com o meio RPMI (CN) e com o DMSO (diluído em meio RPMI) como CB. Além disso, foram contadas as lamínulas que receberam o tratamento com BZN, o CP.

A partir das contagens dos macrófagos não-infectados, infectados e do número de amastigotas, foi possível calcular o índice de internalização, através do cálculo:

$$\% \text{ macrófagos com parasitas fagocitados} \times \text{média do número de parasitas fagocitados por cada macrófago}$$

Obteve-se os percentuais de inibição a partir das contagens realizadas e, assim, foi possível calcular a concentração que inibe 50% do crescimento (CI₅₀) das formas amastigotas. Depois foi possível calcular o índice de seletividade através da razão da CC₅₀ obtida no ensaio de citotoxicidade (conforme item 4.4) pelo CI₅₀ de amastigotas intracelulares.

4.9. Avaliação da atividade leishmanicida dos extratos sobre formas promastigotas *in vitro*

A avaliação da atividade leishmanicida sobre as formas promastigotas seguiu a metodologia descrita por Bortoleti et al. (2018) com modificações. Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram mantidas em meio RPMI [suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 100 µg/mL de estreptomicina e 100 UI/mL de penicilina, em B.O.D (Biological Oxygen Demand)] a 25 °C por meio de repiques semanais para garantir a viabilidade dos parasitas.

Em placas de 96 poços foram adicionados os parasitas em uma concentração de 1x10⁵ parasitas por poço e, então, adicionadas as diferentes concentrações dos extratos de *L. cultratus* (1, 10, 15, 50, 100, 150 e 175 µg/mL) diluídos em meio RPMI.

Alíquotas foram retiradas para contagem em câmara de Neubauer nos tempos de 24, 48, 72 e 96 horas após a adição dos extratos. A contagem foi realizada em microscópio óptico para comparação do crescimento de parasitas tratados em diferentes concentrações do extrato em relação aos parasitas em contato com meio RPMI (CN). Como CP foi utilizado Glucantime® (GLU), droga padrão para o tratamento da Leishmaniose, e DMSO (diluído em meio RPMI) como CB.

Obteve-se os percentuais de inibição a partir das contagens realizadas e, assim, foi possível calcular a concentração inibitória de 50% (CI₅₀) para as formas promastigotas. Depois foi possível calcular o índice de seletividade através da razão da CC₅₀ obtida no ensaio de citotoxicidade (conforme item 4.4) pela CI₅₀ de promastigotas.

4.10. Avaliação da atividade leishmanicida dos extratos sobre formas amastigotas *in vitro*

Para esta análise foi utilizado o método descrito por Tomiotto-Pellissier et al. (2018) com modificações. Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram mantidas em contato com macrófagos peritoneais previamente obtidos (conforme item 4.3) em placas de 24 poços, contendo uma lamínula redonda (13 mm) em cada poço, na proporção de 5 parasitas por macrófago. As placas foram incubadas durante 6 horas à temperatura de 34 °C sob 5% de CO₂. Após as 6 horas de infecção, os parasitas foram retirados, os poços foram lavados com PBS estéril e depois, os macrófagos foram tratados com os extratos nas diferentes concentrações por 48 horas, sob as mesmas condições: 34 °C sob 5% de CO₂.

Após este período, o sobrenadante das placas foi retirado para posteriores análises e as lamínulas contendo os macrófagos foram fixadas com metanol por 20 minutos à temperatura ambiente. O fixador foi removido e as lamínulas lavadas com água destilada; em seguida as células foram coradas com Giemsa (em uma proporção de 3 gotas de Giemsa por mL de água destilada) durante 20 minutos. Após esse período as lamínulas foram lavadas três vezes com água destilada. Ao final, as lamínulas foram montadas sobre lâminas de vidro e fixadas com *Entellan* para posterior análise em microscópio óptico.

Foram contados em microscópio óptico pelo menos 100 macrófagos por lamínula, sendo estes infectados ou não, para cálculo do índice fagocítico. Foram contadas as lamínulas referentes ao tratamento com as diferentes concentrações dos extratos, com o meio RPMI (controle negativo) e com o DMSO (diluído em meio RPMI)

como controle branco. Além disso, foram contadas lamínulas que receberam o tratamento com GLU, o controle positivo.

A partir das contagens dos macrófagos não-infectados, infectados e do número de amastigotas, foi possível calcular o índice de internalização, através do cálculo:

$$\% \text{ macrófagos com parasitas fagocitados} \times \text{média do número de parasitas fagocitados por cada macrófago}$$

Obteve-se os percentuais de inibição a partir das contagens realizadas e, assim, foi possível calcular a concentração que inibe 50% do crescimento (CI₅₀) das formas amastigotas. Depois, foi possível calcular o índice de seletividade através da razão da CC₅₀ obtida no ensaio de citotoxicidade (conforme item 4.4) pelo CI₅₀ de amastigotas intracelulares.

4.11. Quantificação das citocinas IL-1 β e IL-10 por ensaio imunoenzimático

A quantificação das citocinas IL-1 β e IL-10 foi realizada em amostras dos sobrenadantes da cultura celular obtidos do ensaio de amastigotas de *L. amazonensis* (conforme item 4.10) pela técnica de ensaio imunoenzimático, com a utilização de kits comerciais, seguindo as normas do fabricante (R&D[®] Systems, Inc., Minneapolis, MN, EUA).

O nível absoluto de citocina presente no sobrenadante da cultura descrita acima foi calculado com base na curva padrão fornecida pelo kit comercial.

4.12. Análise estatística

Os dados foram submetidos à estatística analítica para comparação das medianas através do teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis, com pós-teste de *Dunn*. Quando obtivemos dados paramétricos, realizou-se comparação das médias através do teste de ANOVA, com pós-teste de *Tukey*. Para tanto, foi adotado o nível de confiança de 95%, com valor de α fixado em 0,05, considerado como significativo $p < 0,05$. Foi utilizado o programa GraphPad Prism versão 6.0 e Microsoft Excel para a análise estatística.

A concentração inibitória de 50% (CI₅₀) foi calculada para as formas promastigotas e amastigotas e a concentração letal de 50% (CL₅₀) foi calculada para as formas tripomastigotas a partir da redução percentual média de parasitas comparada com a dos controles não tratados, ambas usando uma regressão não linear.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

5.1. Obtenção dos extratos

A extração das sementes secas e trituradas de *L. cultratus* (313,26 g) com hexano produziu 95,94 g do extrato LHS, com diclorometano 8,17 g de LDS e com metanol 16,45 g de LMS. A figura 6 apresenta o esquema de obtenção dos extratos de *L. cultratus* (GRIEBLER, 2017).

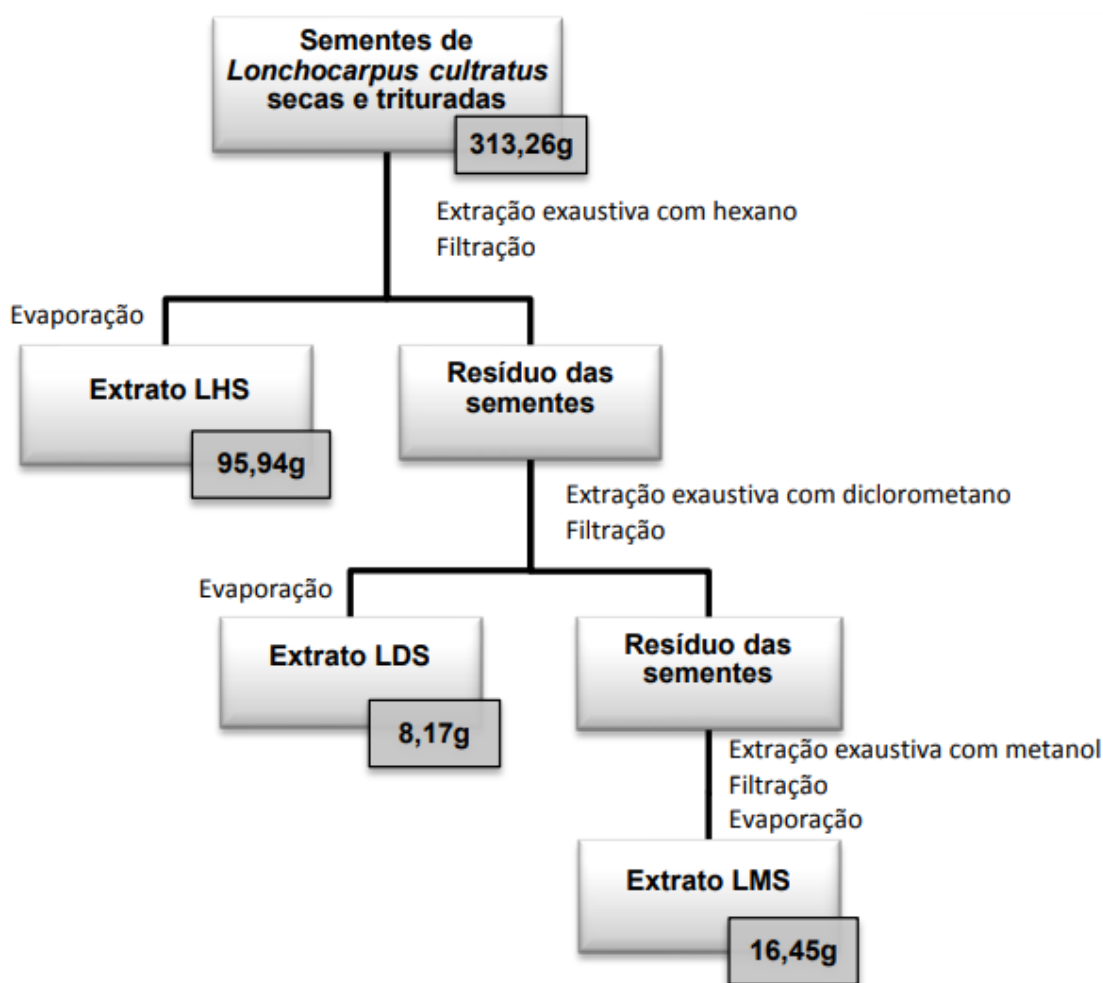


Figura 6 Esquema de obtenção dos extratos LHS, LDS e LMS (GRIEBLER, 2017).

5.2. Caracterização dos extratos

Em estudo realizado por Griebler (2017), o extrato LHS das sementes de *L. cultratus* (95,94 g) foi produzido com um rendimento de 30,63%. Os outros extratos, LDS (8,17 g) e LMS (16,45 g), foram obtidos com rendimentos de 2,61% e 5,25%, respectivamente.

Os espectros de ^1H RMN (500 MHz) dos extratos de LHS, LDS e LMS mostram que os extratos de LHS e LDS são constituídos principalmente por substâncias de

baixa e média polaridade, como as extraídas pelos solventes usados para obtenção do LHS (hexano) e LDS (diclorometano).

O LHS e o LDS mostram um sinal a 13,68 ppm, que indica a presença de hidrogênios em interações fortes, como os do -OH em pontes intramoleculares entre hidrogênio e C = O. Os sinais nesta região estão relacionados a um -OH quelatado, típico de chalconas presentes em espécies do gênero *Lonchocarpus* (BORGES-ARGÁEZ et al., 2002; LIMA et al., 2013). Os sinais obtidos a partir do ¹H NMR de LDS e LHS sugerem a presença de lonchocarpina, através de comparação de dados dos respectivos espectros de RMN com aqueles descritos na literatura (BORGES-ARGÁEZ et al., 2002; LIMA et al., 2013). Ainda de acordo com os sinais obtidos de ¹H RMN do extrato LDS e em comparação com a literatura, é estabelecida a presença de isocordoína (CAAMAL-FUENTES et al., 2015; DA SILVA LANDIM et al., 2019).

Recentemente, da Silva Landim et al. (2019) encontraram isocordoína nas partes aéreas de *L. cultratus*, como demonstrado no passado por Gonçalves de Lima et al. (1975) e Menichini et al. (1982), mostrando que essa chalcona é característica dessa espécie do gênero *Lonchocarpus*. O espectro ¹H RMN de LMS não mostra sinal nas regiões de campo alto, como foi visto nos espectros anteriores, indicando a ausência das chalconas. Os sinais de LMS aparecem principalmente na região entre 5,50-0,80 ppm. Esses sinais são característicos de ligações de hidrogênio polar, ligadas a carbonos ligados a elementos eletronegativos e nos grupos -CH, -CH₂ e -CH₃ de compostos alifáticos, sugerindo a presença de esteroides e terpenos (GRIEBLER, 2017).

5.3. Viabilidade celular

Para avaliar a citotoxicidade dos extratos para as células hospedeiras, foram realizados bioensaios citotóxicos, através de metodologia MTT, com esses extratos vegetais nas concentrações em que foram testados posteriormente contra os parasitas *T. cruzi* e *L. amazonensis*. A Tabela 2 mostra a concentração citotóxica para 50% dos macrófagos (CC₅₀) dos extratos.

Tabela 2 Concentração citotóxica de 50% (CC₅₀) dos extratos LDS, LHS, LMS, GLU e BZN contra macrófagos peritoneais de camundongos.

Extratos	Macrófagos de Balb/C
	CC ₅₀ (µg/mL)
LDS	12,8
LHS	>300
LMS	>300
BZN	98,4
GLU	>300

*LDS: Extrato diclorometânico das sementes de *L. cultratus*; LHS: Extrato hexânico das sementes de *L. cultratus*; LMS: Extrato metanólico das sementes de *L. cultratus*; BZN: Benzonidazol e GLU: Glucantime®.

Os extratos LHS e LMS não foram tóxicos para os macrófagos, como mostrado na Figura 7 (b-c), mantendo a viabilidade das células mesmo na concentração mais alta (175 µg/mL). Já as concentrações 50, 100, 150 e 175 µg/mL de LDS foram tóxicas para os macrófagos testados (Figura 7 a). Para os experimentos posteriores em que foram utilizados macrófagos, foram testadas somente as concentrações não citotóxicas dos três extratos (no caso do LDS, apenas as concentrações 1, 10 e 15 µg/mL).

Viabilidade Celular

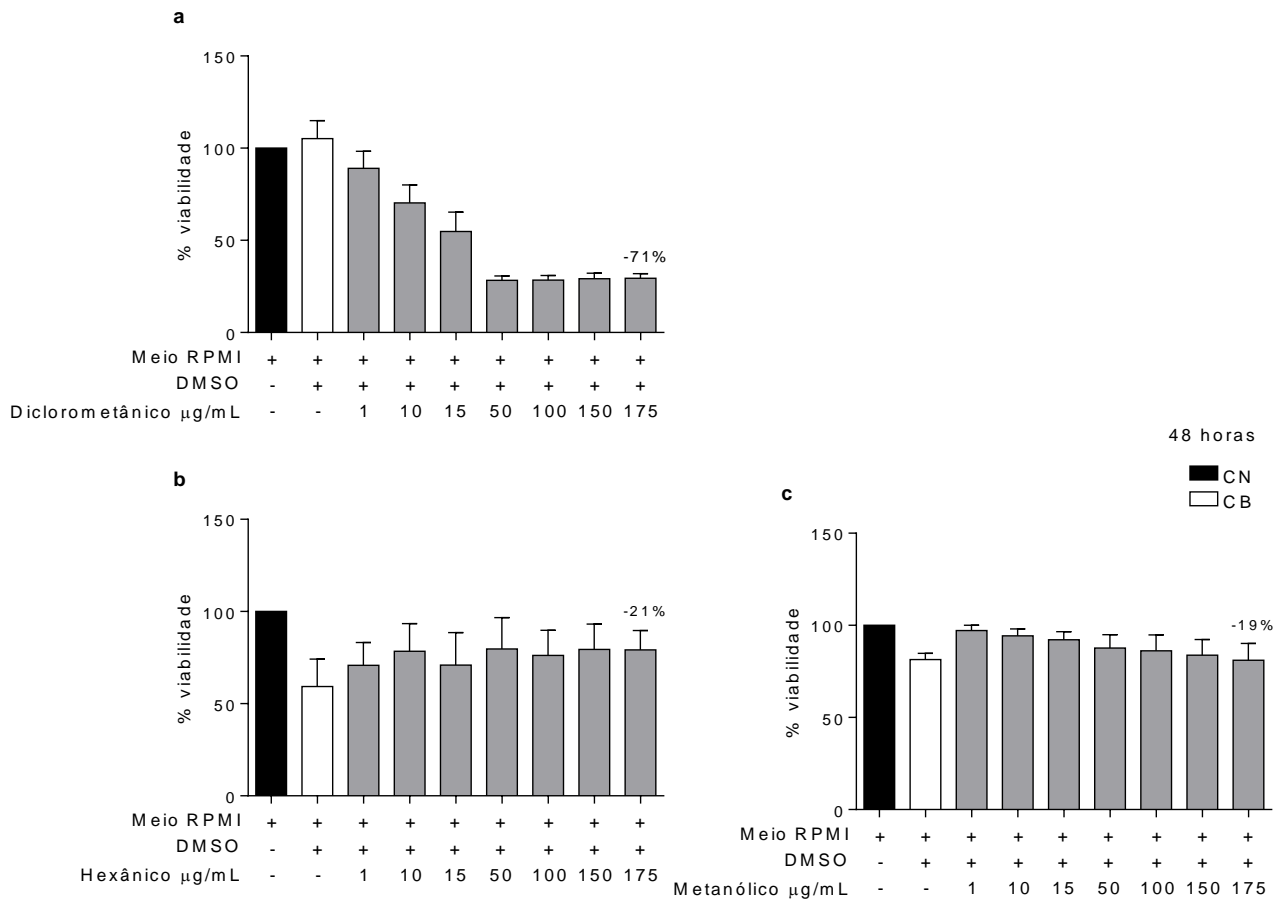


Figura 7 Efeito dos extratos (a) diclorometânico, (b) hexânico e (c) metanólico das sementes de *L. cultratus* sobre a viabilidade de macrófagos murinos. Resultados expressos em média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata (N=3). Os controles correspondem ao meio RPMI (CN) ou meio mais DMSO (CB) na ausência de extratos.

BZN e GLU foram testados nas mesmas concentrações que os extratos e também não foram tóxicos para os macrófagos murinos (Figura 8). Foram obtidos valores de CC_{50} de 98,4 e acima de 300 μ g/mL para o BZN e GLU, respectivamente.

Viabilidade Celular: Controles Positivos

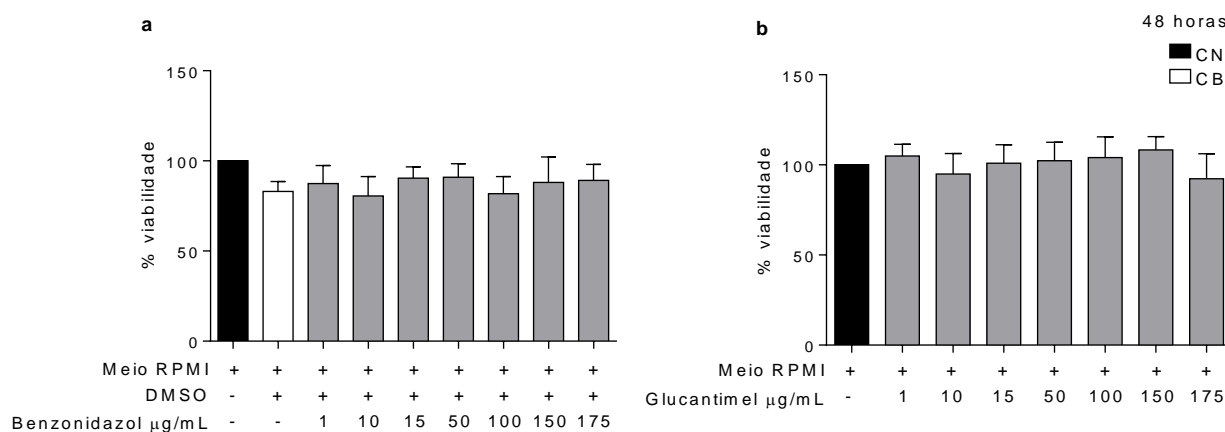


Figura 8 Efeito do Benzonidazol (a) e Glucantime® (b) sobre a viabilidade de macrófagos murinos. Resultados expressos em média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata (N=3). Os controles correspondem ao meio RPMI (CN) ou meio mais DMSO (CB) na ausência do medicamento.

O extrato hexânico de *Lonchocarpus sericeus* apresentou maior toxicidade que seus componentes isolados (derricina e lonchocarpina) em células tumorais de mamíferos e a isocordoína isolada do extrato hexânico de *Lonchocarpus xuul* apresentou toxicidade *in vitro* (CC₅₀ 2,79 µg/mL) (BORGES-ARGÁEZ et al., 2009; CUNHA et al., 2003). Da Silva Landim et al. (2019) confirmaram essa ação em células tumorais com uma fração do extrato hexânico de *L. cultratus* que continha isocordoína, mostrando uma atividade intensa contra várias linhagens celulares humanas, mas sem seletividade em relação ao tecido humano saudável. Esses dados demonstraram que a toxicidade observada no extrato de LDS pode estar relacionada à presença de isocordoína. Alguns estudos demonstraram que o lonchocarpina possui baixa toxicidade, o que foi confirmado aqui pela não toxicidade do extrato de LHS (CUNHA et al., 2003; JEONG et al., 2017).

5.4. Liberação e inibição de NO pelos macrófagos murinos peritoneais

O NO atua em muitos processos fisiológicos, entre eles na regulação do sistema imune (HALLIWELL e GUTTERIDGE, 1984; KIECHLE e MALINSKI, 1993). Tem um papel importante nos vários tipos de processos inflamatórios em mamíferos e, quando secretado em altos níveis por macrófagos ativados, faz parte do arsenal de primeira defesa do organismo com poder microbicida (McMICKING et al., 1997; FLORA FILHO e ZILBERSTEIN, 2000).

Nos macrófagos, o NO pode ser produzido em grande quantidade pelo óxido nítrico sintase induzível (iNOS). Muitos agonistas capazes de induzir iNOS em

macrófagos foram identificados e, dentre eles, o LPS e algumas citocinas como o IFN- γ são os mais caracterizados (HON; MOOCHHALA; KHOO, 1997; SAHA et al., 2004; LOK et al., 2016).

No estudo, a liberação de NO foi verificada após 48 horas de incubação dos macrófagos na presença dos extratos. A Figura 9 (a-c) mostra que os três extratos não foram capazes de estimular a liberação de NO pelos macrófagos de forma significativa. Foi utilizado LPS 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ como controle positivo (CP).

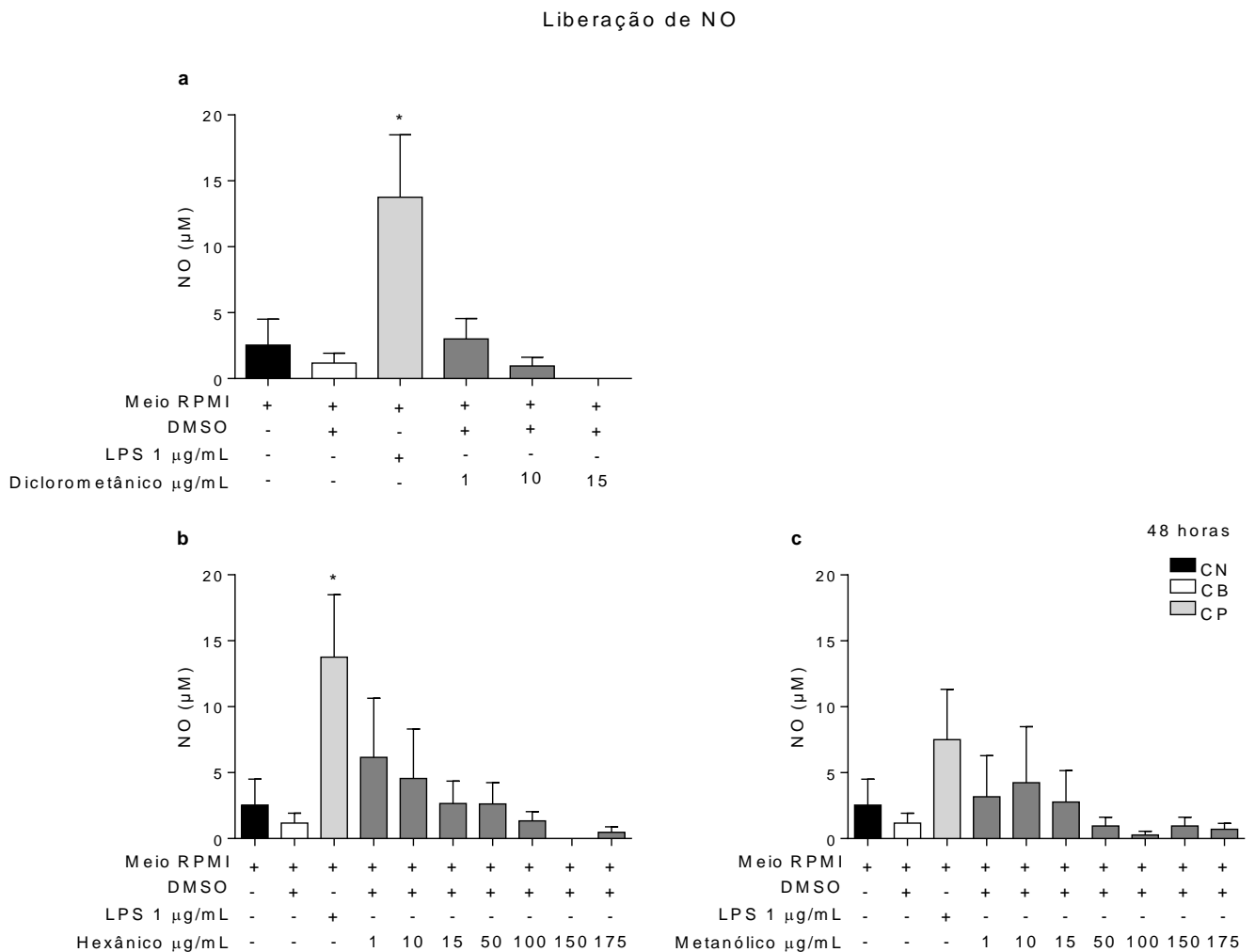


Figura 9 Efeito dos extratos (a) diclorometânico, (b) hexânico e (c) metanólico das sementes de *L. cultratus* sobre a liberação de NO em macrófagos murinos. Resultados expressos em média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata (N=3). Os controles correspondem ao meio RPMI (CN) ou meio mais DMSO (CB) na ausência de extratos. * significa $p < 0,05$ em relação ao CN.

Diante disso, foi avaliada a capacidade de cada extrato de inibir a liberação de NO em macrófagos murinos estimulados com LPS (Figura 10 a-c). De acordo com os resultados obtidos, os três extratos - LDS, LHS e LMS - não inibiram a secreção de

NO pelos macrófagos quando estes foram estimulados por LPS, em comparação com os macrófagos que foram incubados na presença de apenas LPS (1 µg/mL).

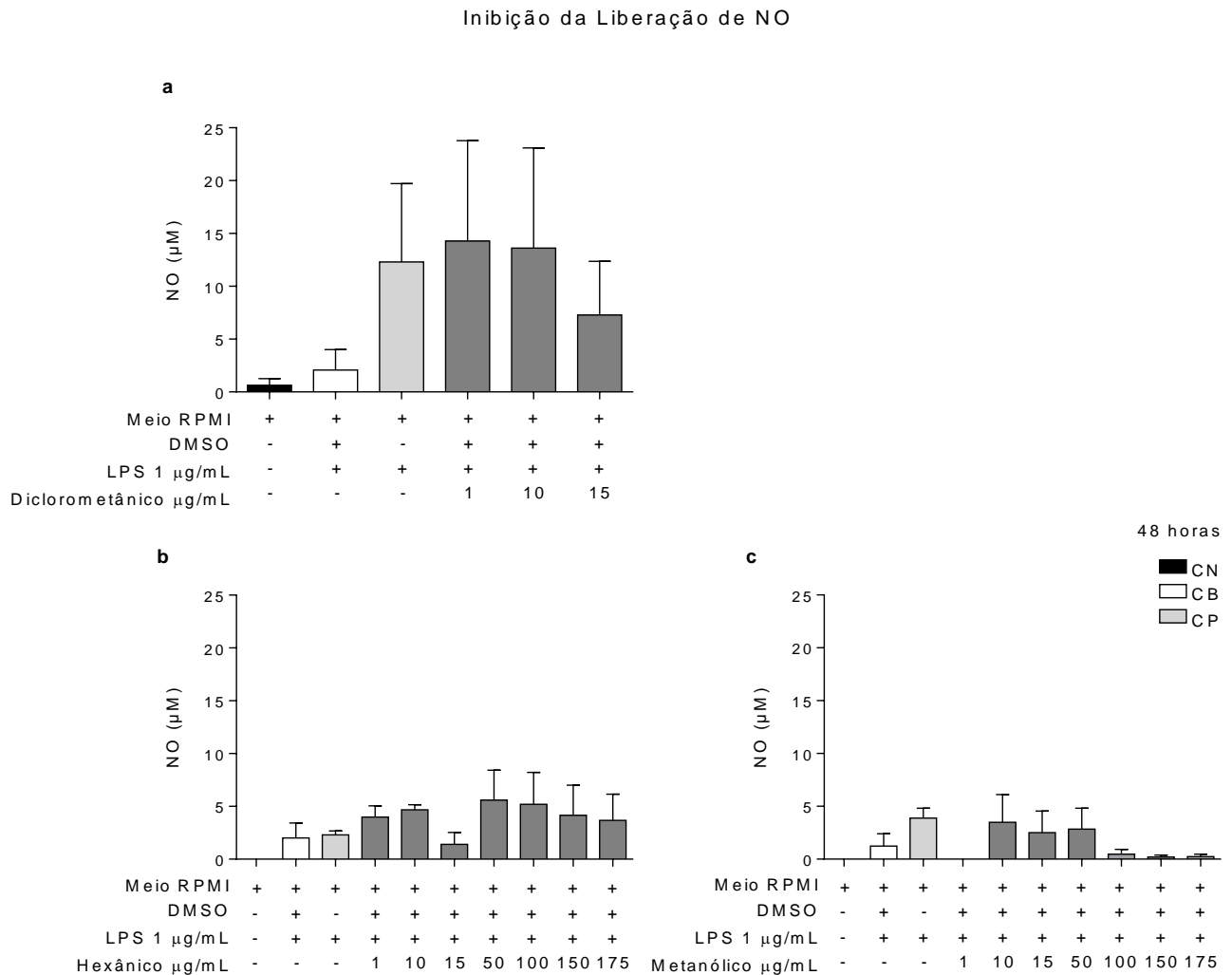


Figura 10 Efeito dos extratos (a) diclorometânico, (b) hexânico e (c) metanólico das sementes de *L. cultratus* sobre a inibição da liberação de NO em macrófagos murinos. Resultados expressos em média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata (N=3). Os controles correspondem ao meio RPMI (CN), meio mais DMSO (CB) e meio mais LPS (CP) na ausência de extratos.

O sistema imunológico demonstra a necessidade de regulação e, uma vez que a resposta imune é iniciada, mecanismos devem existir para controlar a extensão dos seus efeitos e regulá-la de tempos em tempos (LOPES, 2004). A imunomodulação pode ser exercida mediante a potencialização ou com a supressão de elementos do sistema imunológico que pode ocorrer por meio da ação de agentes estimulantes ou supressores (KIRKLEY, 1999). Parte da atividade de compostos imunomoduladores é devido a um efeito direto nas células imunológicas (LOPES, 2004). Assim, é possível avaliar a potência desses agentes com base em medidas da resposta celular *in vitro* (LAWSON e BAUER, 1998).

Embora os extratos não tenham inibido a liberação de NO em macrófagos, Jeong et al (2017) descobriram que a lonchocarpina, presente em nossos extratos LDS e LHS, suprimiu a liberação de NO, TNF- α e IL-6 em células microgлияis estimuladas por LPS, demonstrando que a lonchocarpina é um composto com possível potencial imunomodulatório.

Observa-se que há uma tendência do extrato LMS em inibir a liberação de NO na concentração de 1 $\mu\text{g/mL}$ e em suas concentrações mais altas (100, 150 e 175 $\mu\text{g/mL}$) (Figura 10 c), demonstrando que em uma concentração menor, o extrato pode exercer essa inibição e imunomodular, mas em concentrações mais altas, essa inibição pode ter tido influência do solvente, o DMSO, que demonstrou a tendência de inibição também.

Em estudo realizado por Elisia et al. (2016), o DMSO nas concentrações de 0,25 a 2% suprimiu a expressão da arginase 1 em macrófagos derivados da medula óssea tratados com IL-4 e, que, nas mesmas concentrações, reduz a expressão da iNOS de macrófagos tratados com LPS, sugerindo que o DMSO interfere de maneira significativamente no metabolismo da arginina na célula. Ainda nesse estudo, o DMSO, em concentrações tão baixas quanto 0,08%, reduziu significativamente a produção de óxido nítrico (NO) a partir dessas células e teve efeitos insignificantes na viabilidade de macrófagos nas concentrações testadas (ELISIA et al., 2016), assim como nos resultados obtidos no presente estudo, apresentados anteriormente (conforme item 5.3).

5.5. Atividade tripanocida *in vitro*

Anteriormente, Griebler (2017) verificou atividade tripanocida dos extratos das sementes de *L. cultratus* frente às formas epimastigotas de *T. cruzi*. Nesse estudo, as contagens de parasitas após 72 horas mostraram que o tratamento com os extratos LHS e LDS reduziram significativamente o número de epimastigotas em suas concentrações mais altas (>100 $\mu\text{g/mL}$), comparadas com o controle negativo.

Diante disso, foi realizado estudo com os extratos frente às outras duas formas de *T. cruzi*: tripomastigota e amastigota. Formas tripomastigotas mostraram uma taxa de mortalidade de 41,0%, 40,3% e 65,9% após 24h; e 41,6%, 59,4% e 95,3% após 48 horas diante de extratos de *L. cultratus* (LHS, LMS e LDS, respectivamente) nas concentrações de 175 $\mu\text{g/mL}$, mostrando que a atividade de LDS está muito próxima daquela apresentada pelo BZN (175 $\mu\text{g/mL}$), 70,9% (24h) e 92,6% (48h).

Os três extratos mostraram ser capazes de destruir as formas tripomastigotas (Figura 11 a-c) em concentrações acima de 50 $\mu\text{g/mL}$, visto que apresentaram taxa de mortalidade significativamente maior comparados ao controle não tratado (CN), enquanto o grupo DMSO (CB) não, o que demonstra que o solvente não é responsável pela atividade dos extratos.

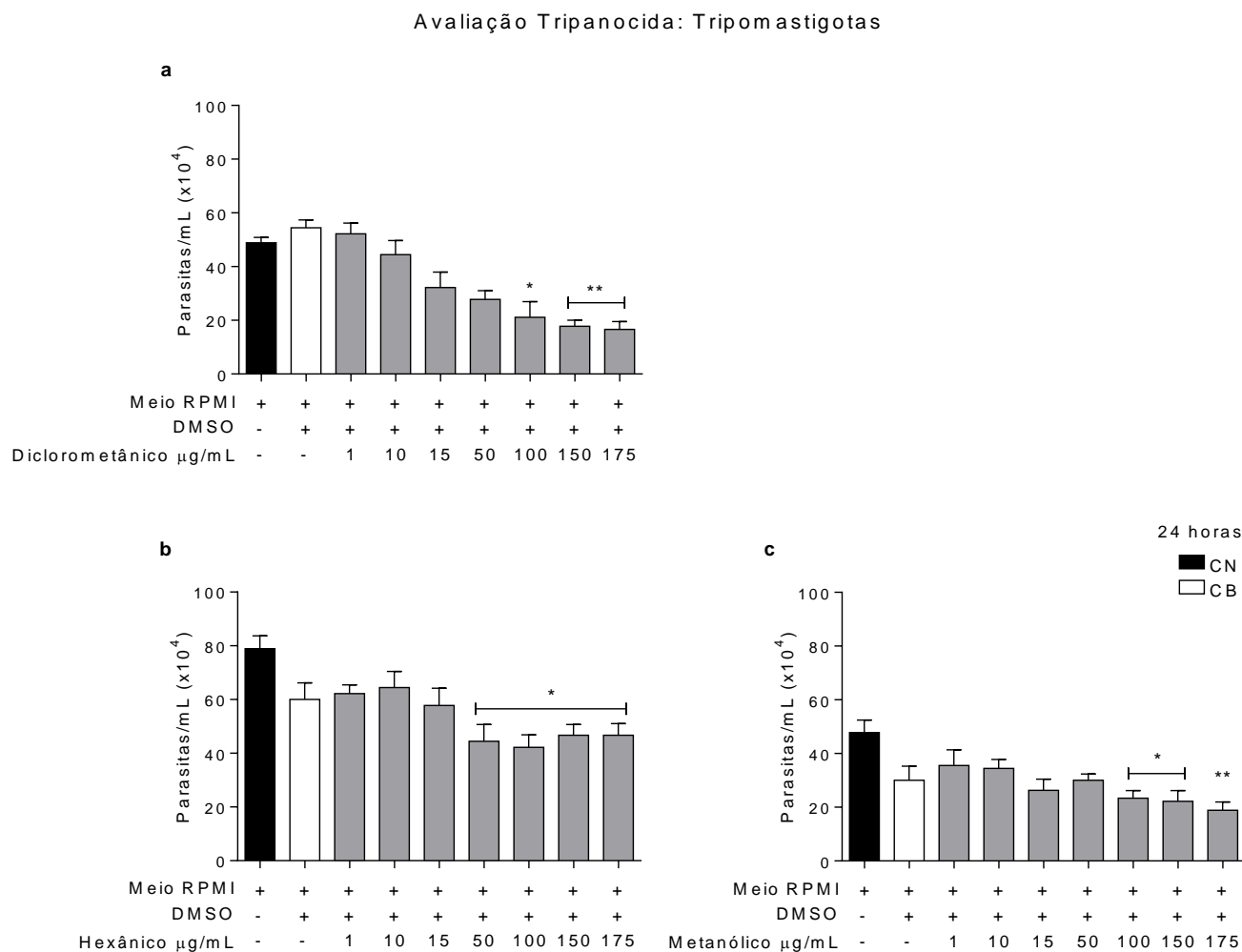


Figura 11 Efeito dos extratos (a) diclorometânico, (b) hexânico e (c) metanólico das sementes de *L. cultratus* sobre forma tripomastigota de *T. cruzi* em 24 horas. Resultados expressos em média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata (N=3). Os controles correspondem ao meio RPMI (CN) ou meio mais DMSO (CB) na ausência de extratos. * e ** significam $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente, em relação ao CN.

O CL_{50} dos três extratos após 24 horas é apresentado na Tabela 3. Esses dados mostram que o LDS é muito ativo contra formas tripomastigotas, com um valor de 8,23 $\mu\text{g/mL}$, valor ligeiramente superior ao observado pelo controle BZN (7,3 $\mu\text{g/mL}$). O LHS e o LMS atingiram valores de 15,1 e 26,1 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente. Esses resultados estão de acordo com o que foi observado no ensaio com as formas epimastigotas (GRIEBLER, 2017), nas quais os extratos LDS e LHS apresentaram

maiores atividades que o LMS, que foi inativo na forma testada. A atividade nas formas tripomastigotas é muito interessante, uma vez que estas são as formas infectantes e devem ser o alvo dos medicamentos.

Tabela 3 Valores de CL₅₀, CI₅₀ e CC₅₀ dos extratos diclorometânico, hexânico e metanólico das sementes de *L. cultratus* sobre as formas tripomastigotas e amastigotas de *T. cruzi* e sobre os macrófagos murinos e respectivos índices de seletividades (IS).

Extratos	Tripomastigotas	Amastigotas	Macrófagos	IS	
	(24h)	(48h)	Balb/C	(epimastigotas)	(amastigotas)
	CL ₅₀ (µg/mL)	CI ₅₀ (µg/mL)	CC ₅₀ (µg/mL)		
LDS	8,23	0,96	12,8	1,56	13,3
LHS	15,1	32,44	>300	>19,9	>9,26
LMS	26,1	31,95	>300	>11,5	>9,39
BZN	7,3	0,61	98,4	13,5	161,3

LDS: extrato diclorometânico; LHS: extrato hexânico; LMS: extrato metanólico; IS (tripo): índice de seletividade sobre tripomastigotas; IS (ama): índice de seletividade sobre amastigotas.

A atividade dos três extratos também foi testada contra formas intracelulares de *T. cruzi*, as amastigotas, e o LDS teve desempenho semelhante ao BZN, com CI₅₀ de 0,96 (BZN 0,61 µg/mL) e inibição de crescimento de 73,15% na concentração de 175 µg/mL. O LHS e o LMS tiveram uma inibição de 47,79 e 24,56% no crescimento de amastigotas a 175 µg/mL, atingindo um CI₅₀ semelhante (32,44 e 31,95 µg/mL, respectivamente).

Todos os tratamentos com os extratos apresentaram diferenças significativas sobre o índice de internalização (número de macrófagos infectados *versus* número de amastigotas) em relação ao grupo não tratado (tratamento apenas com meio RPMI) nas concentrações mais altas (15 µg/mL para LDS e 175 µg/mL para LHS e LMS) (Figura 12 a-c).

O índice de internalização leva em conta tanto o número de macrófagos infectados quanto o número de amastigotas e, por isso, nesse ensaio é possível verificar que os extratos podem ter ação sobre o macrófago, aumentando sua capacidade de realizar a morte das amastigotas que internalizaram, ou ainda, ação direta sobre a amastigota, de ambas as formas diminuindo o índice de infecção.

Assim, o mecanismo pelo qual os extratos diminuíram a presença de amastigotas não é claro, mas os resultados da dosagem de NO em culturas de macrófagos tratados com LDS, LHS e LMS (item 5.4.) apontam para um efeito direto sobre as amastigotas, uma vez que esses extratos não foram capazes de induzir a secreção de NO por macrófagos murinos (Figura 9). Entretanto, seriam necessários

experimentos para avaliar o estímulo de outras vias, como por exemplo, a produção de superóxidos.

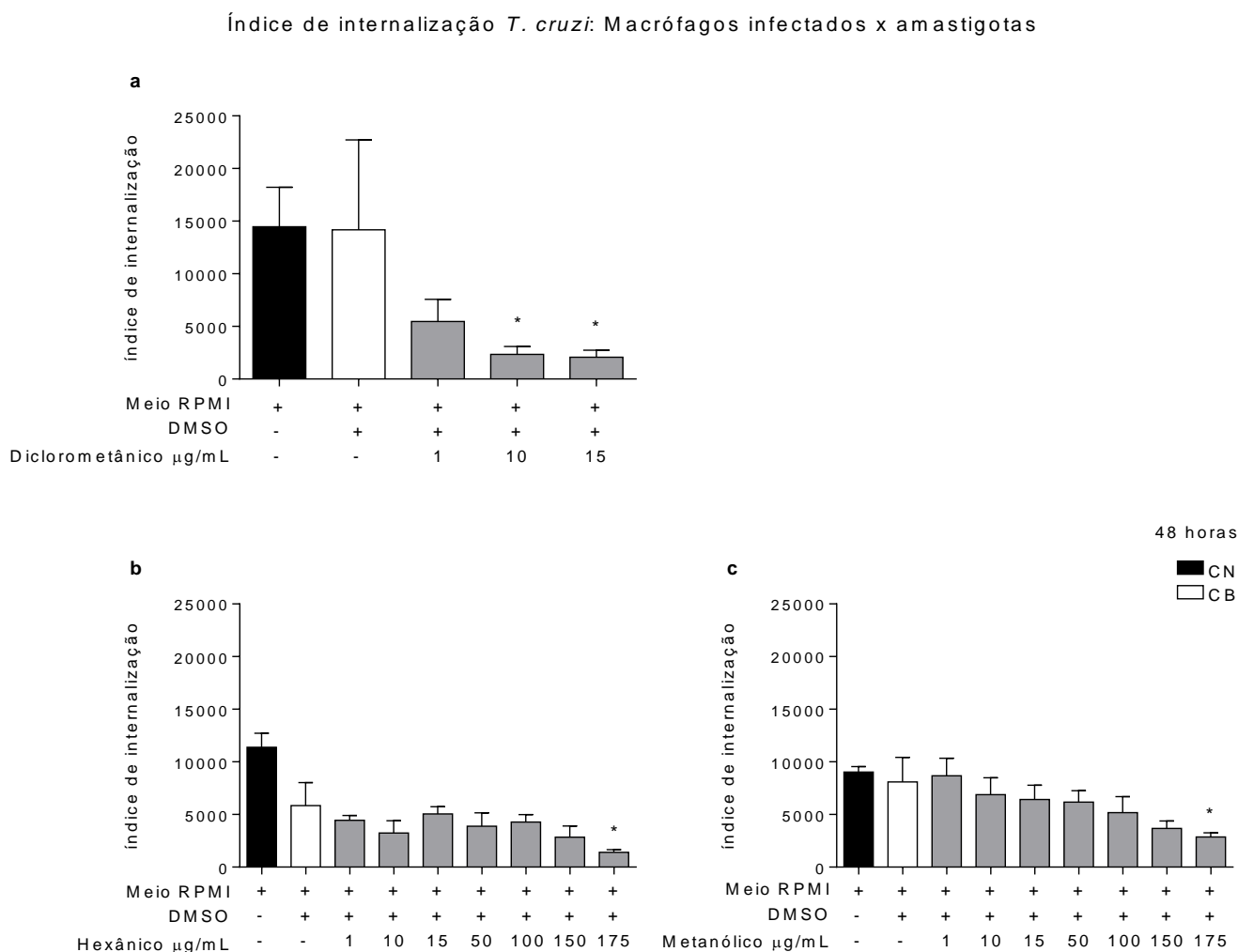


Figura 12 Efeito dos extratos (a) diclorometânico, (b) hexânico e (c) metanólico das sementes de *L. cultratus* sobre o índice de internalização (número de macrófago infectados x número de amastigotas) de *T. cruzi*. Resultados expressos em média \pm SEM de dois experimentos independentes em duplicata (N=2). Os controles correspondem ao meio RPMI (CN) ou meio mais DMSO (CB) na ausência de extratos. *significa $p < 0,05$ em relação ao CN.

Borges-Argáez et al. (2009) demonstraram que as chalconas isocordoína e 2', 4'-di-hidroxi-3' - (γ , γ -dimetilalil) -di-hidrochalcone isoladas das raízes de *L. xuul* possuem atividade anti-*T. cruzi* contra epimastigotas de *L. xuul*.

Autores avaliam o potencial de novos compostos utilizando o índice de seletividade (IS), que é calculado como a razão entre a concentração citotóxica de 50% (CC₅₀) para células e a concentração inibitória de 50% (CI₅₀) para as diferentes formas parasitárias. Os extratos LMS e LHS, como mostrado anteriormente, não foram tóxicos para os macrófagos, mantendo a viabilidade das células mesmo nas concentrações mais altas. Estes dados sugerem que o LHS é o extrato que melhor

distinguiu os macrófagos das formas tripomastigotas e, embora o LHS e o LMS tenham uma baixa eficácia contra as formas amastigotas, ambos foram capazes de distinguir essas formas das células de mamíferos.

O valor de CC_{50} do extrato de LDS (12,8 $\mu\text{g/mL}$) foi tóxico para macrófagos murinos, resultando em um baixo IS contra tripomastigotas (1,56), mas com uma melhor capacidade de distinguir amastigotas, com um IS de 13,3. O extrato de LHS apresentou a CC_{50} de $>300 \mu\text{g/mL}$, que gerou um IS de $>19,9$ e $>9,26$ contra as duas formas do parasita (tripomastigotas e amastigotas, respectivamente), mostrando ser o extrato mais seletivo. O BZN apresentou boa seletividade, com um IS de 13,5 e 161,3, semelhante ao encontrado por outros autores (MEIRA et al., 2016; PIZZO et al., 2012).

5.6. Atividade leishmanicida *in vitro*

Os três extratos de sementes de *L. cultratus* foram avaliados quanto à sua atividade contra promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*. Formas promastigotas mostraram uma taxa de inibição de crescimento contra extratos de *L. cultratus* de 11,6%, 78,1% e 78,22% após 96h (LMS, LDS e LHS, respectivamente) na concentração de 175 $\mu\text{g/mL}$, mostrando que a atividade dos extratos LDS e LHS é superior daquela apresentada pelo GLU (175 $\mu\text{g/mL}$) de 55% (96h).

Apenas os tratamentos com os extratos LDS e LHS apresentaram diferenças significativas (Figura 13 a-c) na taxa de inibição de crescimento em relação ao grupo controle (não tratado) nas concentrações acima de 50 $\mu\text{g/mL}$, enquanto o grupo DMSO (CB) não, o que demonstra que o solvente não é responsável pela atividade dos extratos. O GLU apresenta baixa eficácia em modelos *in vitro* de promastigotas, necessitando de doses acima de 250 $\mu\text{g/mL}$ para diminuir significativamente o número de parasitas após 96 horas (ADRIAZOLA et al., 2014; KANGUSSU-MARCOLINO, et al., 2015).

Avaliação Leishmanicida: Promastigotas

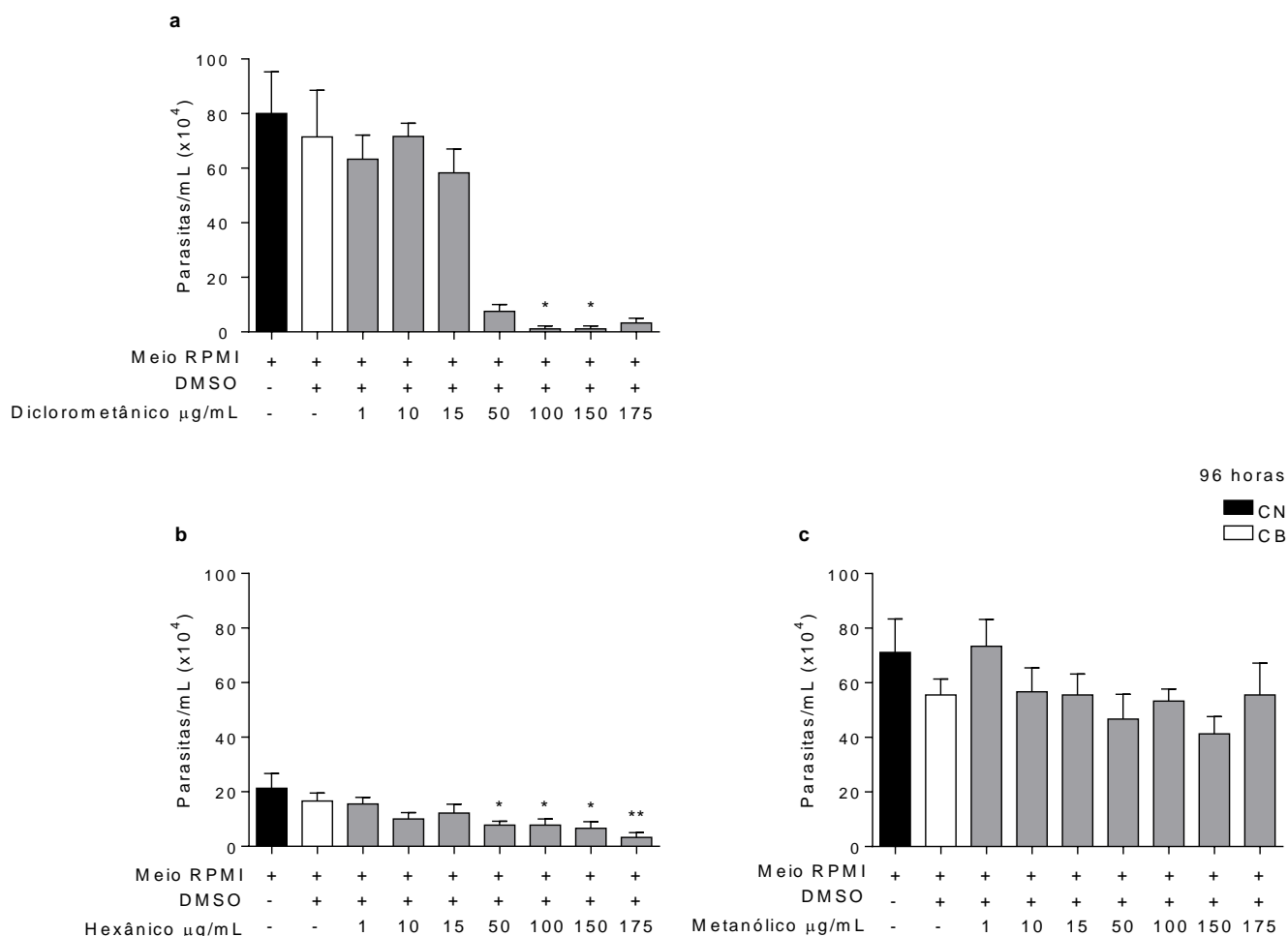


Figura 13 Efeito dos extratos (a) diclorometânico, (b) hexânico e (c) metanólico das sementes de *L. cultratus* sobre promastigotas de *L. amazonensis*. Resultados expressos em média \pm SEM de três experimentos independentes em triplicata (N=3). Os controles correspondem ao meio RPMI (CN) ou meio mais DMSO (CB) na ausência de extratos. * e ** significam $p < 0,05$ e $p < 0,01$, respectivamente, em relação ao CN.

Os valores de CI_{50} , calculados a partir dos percentuais de inibição, estão na Tabela 4. Os extratos LDS e LHS apresentaram valores próximos de CI_{50} para a forma promastigota, de 19,54 e 21,37 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente, valores superiores ao encontrado para o GLU, de 0,92 $\mu\text{g/mL}$. O extrato LMS apresentou-se inativo para a forma promastigota, ou seja, apresentou baixa diminuição da taxa de inibição para essa forma.

Tabela 4 Valores de CI_{50} e CC_{50} atingidos pelos extratos diclorometânico, hexânico e metanólico das sementes de *L. cultratus* sobre as formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis* e sobre os macrófagos murinos e respectivos índices de seletividade (IS).

Extratos	Promastigotas	Amastigotas	Macrófagos	IS	IS
	(96h)	(48h)	Balb/C	(promastigotas)	(amastigotas)
	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CI_{50} ($\mu\text{g/mL}$)	CC_{50} ($\mu\text{g/mL}$)		
LDS	19,54	0,67	12,8	0,65	19,1
LHS	21,37	20,72	>300	>14	>14,5
LMS	inativo	11,57	>300	inativo	25,9
GLU	0,92	0,65	>300	>26,2	>461,5

Os extratos também foram avaliados contra as formas intracelulares de *L. amazonensis* e os três apresentaram diferenças significativas sobre o índice de internalização (número de macrófagos infectados *versus* número de amastigotas) (Figura 14 a-c). Para esta forma, o LDS, que foi testado apenas nas concentrações não citotóxicas, apresentou-se mais ativo, com uma CI_{50} de 0,67 $\mu\text{g/mL}$, o valor mais próximo do encontrado para o GLU (0,65 $\mu\text{g/mL}$) e inibição de crescimento de 59,91% na concentração de 15 $\mu\text{g/mL}$. O LHS apresentou diferença significativa sobre o índice de internalização nas concentrações 100, 150 e 175 $\mu\text{g/mL}$, CI_{50} de 20,72 e uma inibição de 80,7% no crescimento de amastigotas a 175 $\mu\text{g/mL}$. O LMS apresentou diferença significativa a partir da concentração de 10 $\mu\text{g/mL}$, inibição de 65,32% e obteve uma CI_{50} de 11,57.

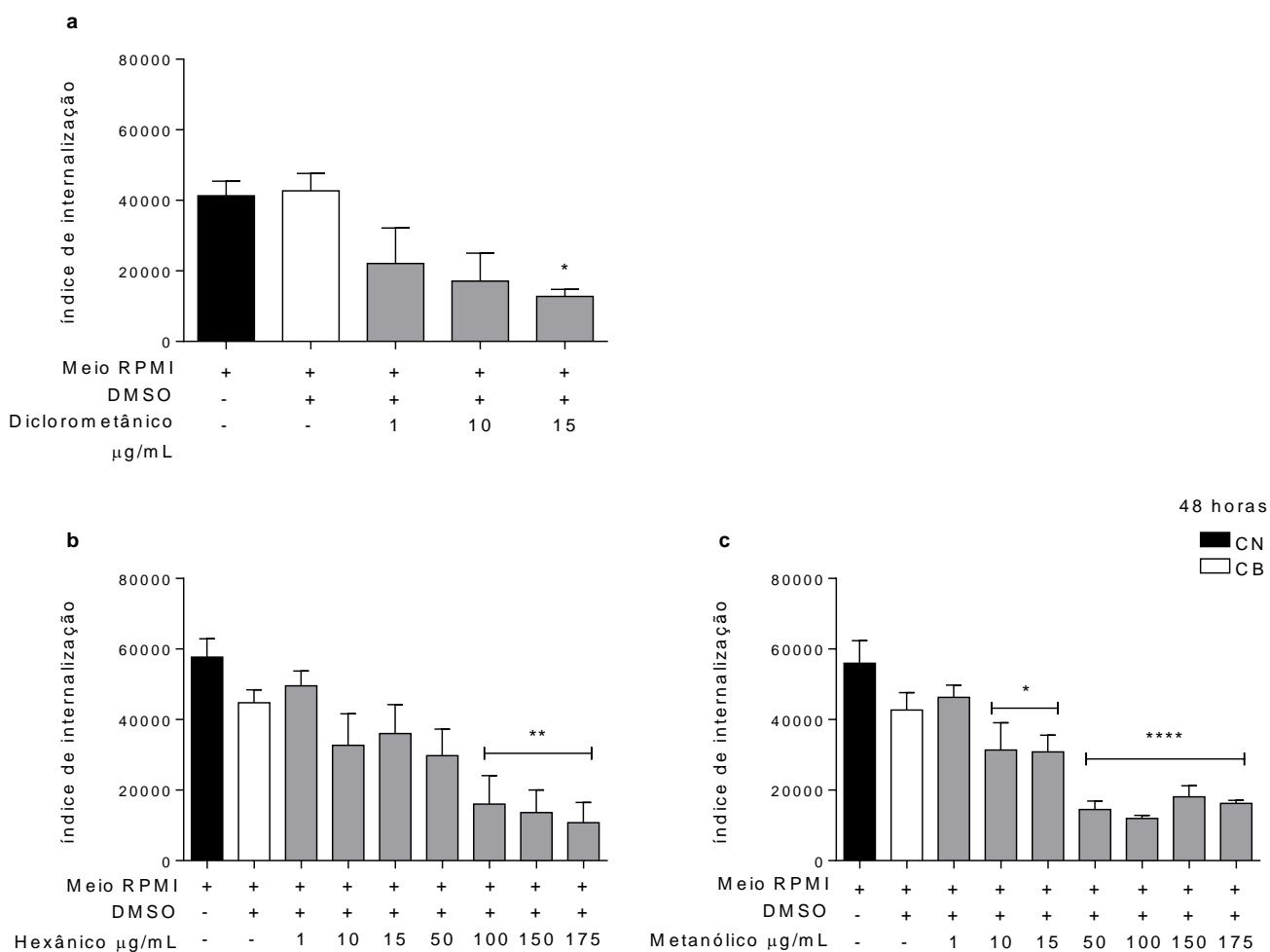
Índice de internalização *L. amazonensis*: Macrófagos infectados x amastigotas

Figura 14 Efeito dos extratos (a) diclorometânico, (b) hexânico e (c) metanólico das sementes de *L. cultratus* sobre o índice de internalização (número de macrófago infectados x número de amastigotas) de *L. amazonensis*. Resultados expressos em média \pm SEM de dois experimentos independentes em duplicata (N=2). Os controles correspondem ao meio RPMI (CN) ou meio mais DMSO (CB) na ausência de extratos. *, ** e **** significam $p < 0,05$, $p < 0,01$ e $p < 0,0001$, respectivamente, em relação ao CN.

Um composto natural anti-*Leishmania* é considerado seguro quando o IS > 10 (ORYAN, 2015). Além disso, é importante realizar testes de toxicidade em macrófagos, não apenas para determinar o IS, mas também porque os parasitas de *Leishmania* habitam essas células (WALKER et al., 2014).

Os extratos LHS e LMS mantiveram a viabilidade dos macrófagos murinos mesmo nas concentrações mais altas. Para a forma promastigota, LMS apresentou-se inativo, porém é o extrato que melhor distinguiu os macrófagos das formas amastigotas, com IS de 25,9. Já o LHS apresentou IS > 14 para ambas as formas (promastigota e amastigota), sugerindo ser capaz de distinguir as formas parasitárias das células de mamíferos.

O principal mecanismo da defesa imune inata contra a *Leishmania* é a fagocitose e o mecanismo de explosão oxidativo microbicida, dependente do oxigênio, que é altamente destrutivo para o parasita (ANTOINE et al., 2004; DE SALDANHA et al., 2012). Como foi visto anteriormente, os extratos estudados não estimularam a liberação de NO e nem mesmo inibiram a liberação quando estimulados por LPS. Isso mostra que os extratos provavelmente agiram de forma direta sobre os parasitas.

O extrato LMS foi o que teve maior diminuição do índice de internalização quando comparado aos outros extratos. Porém, não foi efetivo contra a forma promastigota de *L. amazonensis*. De acordo com os sinais obtidos a partir dos espectros de ^1H RMN, nesse extrato foram encontrados esteroides e terpenos. No entanto, Teles et al. (2011) demonstraram que triterpenos isolados foram capazes de promover ação leishmanicida sobre as formas promastigotas de *L. amazonensis*.

Outra espécie do gênero *Lonchocarpus*, *L. nicou* demonstrou atividade leishmanicida a partir de um extrato metanólico. No entanto, seus compostos isolados não são semelhantes aos encontrados neste estudo; eles eram mostrados como estiletos, com potentes ações (IC_{50} 5,5 e 3,9 $\mu\text{g/mL}$) (FUCHINO et al., 2013).

Além disso, Torres-Santos et al. (2004) verificaram que dois triterpenoides de *Pourouma guianensis*, os ácidos ursólico e oleanólico, mostraram forte atividade antileishmania contra as duas formas de *L. amazonensis* na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$. A atividade antileishmania do ácido oleanólico foi direta contra o parasita e não devido à ativação de intermediários de NO por macrófagos, mas esse triterpenoide também inibiu significativamente a capacidade fagocítica dessas células em concentrações acima de 40 $\mu\text{g/mL}$, indicando efeito citotóxico. No entanto, o mecanismo de ação pelo qual os triterpenos inibem o crescimento de formas promastigotas de *Leishmania spp* ainda não foi totalmente elucidado (LIMA et al., 2011).

Já a atividade do extrato LDS pode estar relacionada à presença da chalcona isocordoína, que quando obtida de outra espécie do gênero *Lonchocarpus*, a *L. xuul*, demonstrou ter propriedade leishmanicida contra promastigotas de *L. amazonensis* com CI_{50} de 26,7 $\mu\text{g/mL}$ (BORGES-ARGÁEZ et al., 2007), atividade menor do que a encontrada para os extratos LDH e LHS (19,54 e 21,37 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente). Mais tarde, foi verificado que a isocordoína tem ação sobre promastigotas de *Leishmania mexicana* em estudo realizado com a mesma planta (BORGES-ARGÁEZ et al., 2009).

Não foram encontrados estudos que relatassem a atividade da lonchocarpina, presente nos extratos LHS e LDS, contra as formas parasitárias de *Leishmania spp*.

No entanto, Cunha et al. (2003) não encontraram atividade antimicrobiana a partir do extrato hexânico de *L. sericeus*, o qual continha derricina e lonchocarpina.

5.7. Liberação de citocinas: IL-1 β e IL-10

As citocinas são mediadores solúveis liberados por linfócitos e células do sistema fagocitário. Além de serem essenciais na comunicação intercelular e em muitos processos fisiológicos e patofisiológicos, modulam a inflamação e a imunidade, regulando o crescimento e a diferenciação de leucócitos e também de células não leucocitárias (OPPENHEIM et al., 1994; LOPES, 2004).

Com a capacidade de ativar macrófagos e sua atividade fagocítica no início da infecção, as citocinas desempenham um papel importante no resultado clínico da leishmaniose (DE OLIVEIRA e BRODSKYN, 2012; DA SILVA, et al., 2013).

Citocinas como TNF- α , IL-6, IL-1 β e IL-10 e os mediadores H₂O₂ e NO são secretados pelos macrófagos para eliminar a invasão bacteriana (DAVIES et al., 2013). A IL-10 é uma citocina anti-inflamatória liberada na fase mais tardia da resposta imune e é capaz de regular negativamente a resposta adaptativa através da inibição de várias funções dos macrófagos e expressão e atividade de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β (MOORE et al., 2001; AYALA et al., 2019).

Os sobrenadantes dos ensaios para a verificação de atividade dos extratos frente às formas amastigotas de *L. amazonensis* foram analisados quanto a presença das citocinas IL-1 β e IL-10. A citocina IL-1 β não foi detectada nos grupos que receberam tratamento nas concentrações de 15 μ g/mL do LDS e de 10, 15, 50, 150 e 175 μ g/mL do LHS. Nas concentrações do LMS em que houve a detecção de IL-1 β não foi obtida diferença significativa em relação ao controle não tratado (meio RPMI) (Figura 15 a-c).

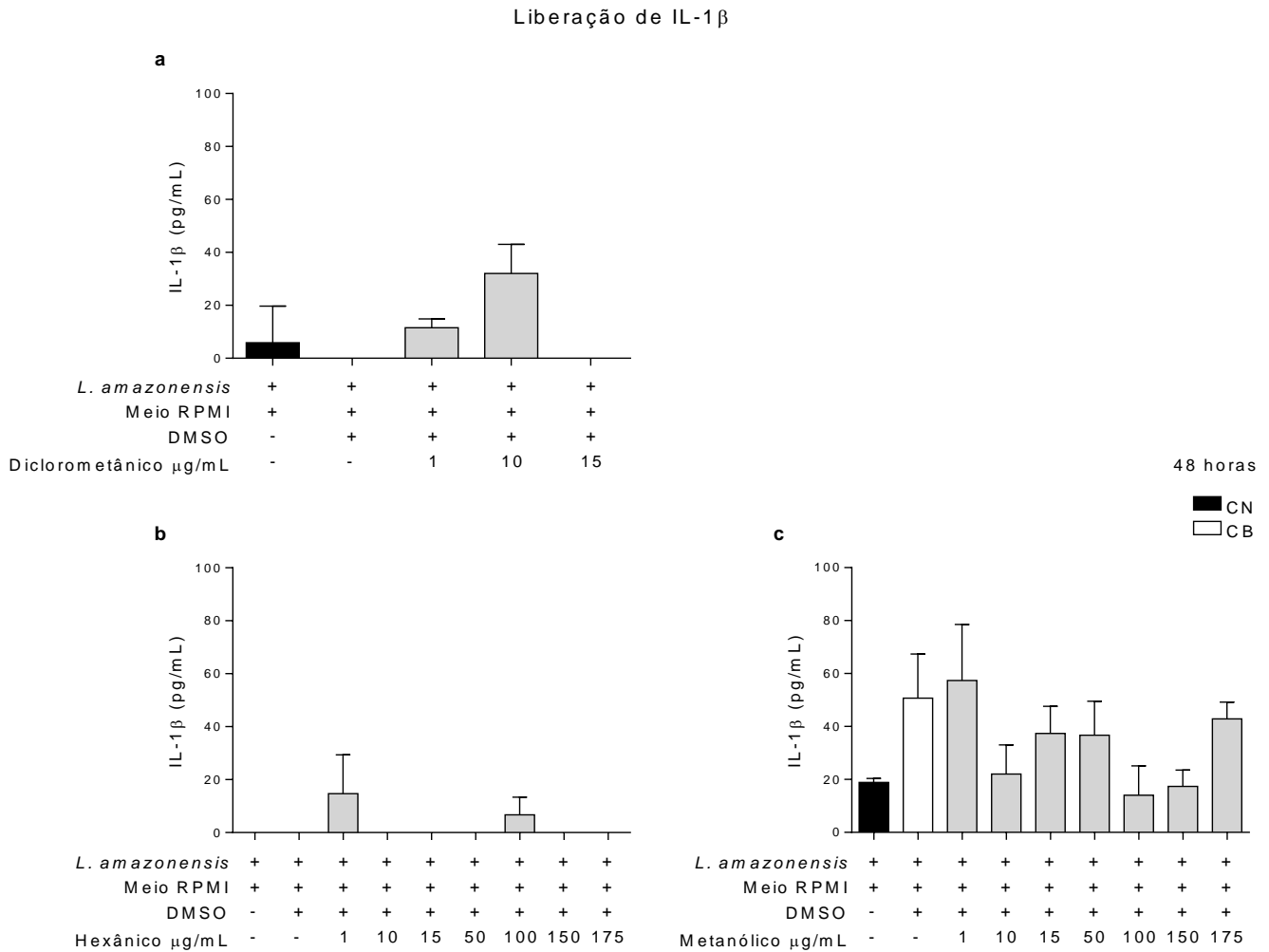


Figura 15 Liberação de IL-1 β por macrófagos murinos peritoneais previamente infectados com *L. amazonensis* e tratados com os extratos (a) diclorometânico, (b) hexânico e (c) metanólico das sementes de *L. cultratus* por 48 horas. Resultados expressos em média \pm SEM de dois experimentos independentes em duplicata. Os controles correspondem ao meio RPMI (CN) ou meio mais DMSO (CB) na ausência de extratos.

Jeong et al (2017) descobriram que a lonchocarpina, presente nos extratos LDS e LHS, aumentou a produção de IL-10 em células microgliais estimuladas por LPS. No entanto, na presente dosagem dos sobrenadantes dos ensaios anteriores, a IL-10 não foi detectável pela metodologia realizada.

Os extratos de sementes de *L. cultratus* não foram capazes de estimular a liberação da citocina IL-10 e IL-1 β de forma significativa após o contato dos macrófagos com a *L. amazonensis*. Para melhor entendimento do efeito dos extratos sobre a liberação de citocinas, se faz necessária a dosagem dessas citocinas em macrófagos isolados, sem o contato prévio e infecção por parasitas.

6. CONCLUSÃO

Os extratos LHS e LMS oriundos das sementes de *L. cultratus* não apresentaram citotoxicidade em macrófagos peritoneais de Balb/c. O extrato LDS foi citotóxico nas concentrações a partir de 50 µg/mL. Os três extratos não imunomodularam os macrófagos de maneira significativa em relação à liberação de NO.

Ao avaliar a atividade tripanocida e leishmanicida dos extratos, foi possível verificar seu potencial na ação *in vitro* contra os parasitas. Os três extratos apresentaram atividade anti-*T. cruzi*, sendo a do extrato LDS mais acentuada que as demais, que pode ser atribuída à presença da isocordoína no extrato. Este efeito mais pronunciado do LDS no *T. cruzi* é acompanhado por uma maior toxicidade em macrófagos. Sendo assim, os extratos LMS e LHS, apesar de exibirem menor atividade tripanocida que o extrato LDS, não foram tóxicos para os macrófagos e, portanto, apresentaram maiores índices de seletividade.

Para a *Leishmania amazonensis* na forma promastigota, apenas os extratos LDS e LHS foram efetivos e, para as formas amastigotas, os três extratos apresentaram ação leishmanicida. O extrato LDS também foi o que apresentou a atividade mais acentuada contra os parasitas. Além disso, os três extratos não estimularam a liberação das citocinas IL-1β e IL-10 por macrófagos previamente infectados por *L. amazonensis*.

Mediante os resultados encontrados, os extratos de *L. cultratus* podem ser explorados quanto à atividade antiprotozoária. Observa-se a necessidade da realização de ensaios mais aprofundados e de buscar conhecer os mecanismos pelos quais os extratos exercem as ações diretas sobre os parasitas, a fim de se obter uma alternativa terapêutica potencial para as patologias tratadas neste estudo.

7. REFERÊNCIAS

ABRAHAMSOHN, I. A.; da SILVA, A. P.; COFFMAN, R. L. Effects of interleukin-4 deprivation and treatment on resistance to *Trypanosoma cruzi*. **Infection and Immunity**. 68: 1975-1979, 2000.

ADRIAZOLA, I. O.; AMARAL, A. E. do; AMORIM, J. C.; CORREIA, B. L.; PETKOWICZ, C. L. O.; MERCÊ, A. L. R. & NOLETO, G. R. Macrophage activation and leishmanicidal activity by galactomannan and its oxovanadium (IV/V) complex *in vitro*. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 132, p. 45–51, 2014.

ALEXANDER, J.; SATOSKAR, A. R.; RUSSELL, D. G. *Leishmania* species: models of intracellular parasitism. **Journal of Cell Science**; 112(Pt 18):2993-3002, 1999.

ANDRADE, J. P. et al. I Diretriz Latino Americana para o Diagnóstico e Tratamento da Cardiopatia Chagásica. [I Latin American guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas cardiomyopathy]. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**; 97 Suppl 3:1–4, 2011.

ANTOINE, J. C.; PRINA, E.; COURRET, N.; LANG, T. *Leishmania spp.*: on the interactions they establish with antigen-presenting cells of their mammalian hosts. **Advances in Parasitology**, v. 58: p. 1–68, 2004.

ANTUNES, M. I.; CARDONI, R. L. IL-12 and IFN- γ production, and NK cell activity, in acute and chronic experimental *Trypanosoma cruzi* infections. **Immunology Letters**, v. 71 p. 103–109, 2000.

ANVERSA, L.; TIBURCIO, M. G. S.; PEREIRA, V. B. R.; RAMIREZ, L. E. Human leishmaniasis in Brazil: A general review. **Revista da Associação Médica Brasileira**; 64(3):281-289, 2018.

ARGOLO, A. M.; FELIX, M.; PACHECO, R.; COSTA, J. Doença de Chagas e seus Principais Vetores no Brasil, 1 ed. Rio de Janeiro: **Imperial Novo Milênio**, 2008.

ASSCHE, T.V.; DESCHACHT, M.; LUZ, R. A. I.; MAES, L.; COS, P. *Leishmania*-macrophage interactions: Insights into the redox biology, **Free Radical Biology and Medicine**, 51 337–351, 2011.

AYALA, T. S. A hiperglicemia altera o perfil inflamatório e imunometabólico de macrófagos derivados de medula óssea de camundongos. Thais Soprani Ayala — São Paulo, 2019. 153 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Farmácia (Fisiopatologia e Toxicologia); Universidade de São Paulo, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, 2019.

BAKER, M. C. et al. Mapping, monitoring and surveillance of neglected tropical diseases: towards a policy framework. **The Lancet**, [S.I.], v. 375, p. 231-238, 2010.

BARROS, P. C. J.; MARKMAN, F. B. Clinical and echocardiographic predictors of mortality in chagasic cardiomyopathy—systematic review. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**.102(6):602–10, 2014.

BATISTA, F. M. A.; MACHADO, F. F. O. A.; SILVA, J. M. O.; MITTMANN, BARJA, J. P. R.; SIMIONI, A. R. Leishmaniose: Perfil Epidemiológico dos Casos Notificados no Estado do Piauí entre 2007 e 2011. **Revista Univap**, v. 20, n. 35, 2014.

BEZERRA, W. S.; MENEGUETTI, D. U. O.; CAMARGO, L. M. A. A Busca de fármacos para tratamento da Tripanossomíase Americana: 103 anos de negligência. **Saúde (Santa Maria)**, v.38, n.1, 2012.

BOCCHI, E. A. et al. Chronic Chagas Heart Disease Management: From Etiology to Cardiomyopathy Treatment. **Journal of The American College of Cardiology**, [S.l.], v. 70, n. 12, p. 1510-1524, 2017.

BORGES-ARGAEZ, R.; BALNBURY, L.; FLOWERS, A.; GIMÉNEZ-TURBA, A.; RUIZ, G.; WATERMAN, P. G.; PEÑA-RODRIGUEZ, L. M. Antiprotozoal and cytotoxic studies on some isocordoin derivatives. **Planta Medica**, v.75, n.12, 2009.

BORGES-ARGAEZ, R.; BALNBURY, L.; FLOWERS, A.; GIMENEZ-TURBA, A.; RUIZ, G.; WATERMAN, P. G.; PENA-RODRIGUEZ, L. M. Cytotoxic and antiprotozoal activity of flavonoids from *Lonchocarpus spp.* **Phytomedicine**, v.14, p.530-533, 2007.

BORGES-ARGAEZ, R.; PEÑA-RODRÍGRUES, L. M.; WATERMAN, P. G. Flavonoids from the stem bark of *Lonchocarpus xuul*. **Phytochemistry**, v.54, p.611-614, 2000.

BORGES-ARGÁEZ, R.; PEÑA-RODRIGUEZ, L. M.; WATERMAN, P. G. Flavonoids from two *Lonchocarpus* species of the Yucatan Peninsula. **Phytochemistry**. 60:533–540, 2002.

BORTOLETI, B. T. S., et al. Grandiflorenic acid promotes death of promastigotes via apoptosis-like mechanism and affects amastigotes by increasing total iron bound capacity. **Phytomedicine**, v. 46, p. 11–20, 2018.

BRASIL. **Manual de vigilância da leishmaniose tegumentar**. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.

BRASIL. **Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral**. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Brasília: Ministério da Saúde, 2014.

BRASIL. **Portaria nº 2712, de 12 de Novembro de 2013**. Ministério da Saúde. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. Redefine o regulamento técnico de procedimentos hemoterápicos. [Internet]. Brasília; ANVISA; 2013.

BRAVO, J. A., SAUVAIN, M., GIMENEZ, A., BALANZA, E., LAURENT, S., LAPREVOTE, O., MASSIOT, G., LAVAUD, C. Trypanocidal with anolides and with anolide glycosides from *Dunalia brachyacantha*. **Journal of Natural Products**. 64: 720–725, 2001.

BRENER, Z.; ANDRADE, Z. A.; BARRAL NETO, M. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas, Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2. ed., 2000.

BRENER, Z.; GAZZINELLI, R. T. Immunological control of *Trypanosoma cruzi* infection and pathogenesis of Chagas' disease. **International Archives of Allergy and Immunology**. v. 114, n. 2, p. 103-10, 1997.

CAAMAL-FUENTES, E. E.; PERAZA-SÁNCHEZ, S. R.; TORRES-TAPIA, L. W.; MOOPUC, R. E. Isolation and identification of cytotoxic compounds from *Aeschynomene fascicularis*, a mayan medicinal plant. **Molecules**, v. 20, p. 13563–13574, 2015.

CAMARGO, M. M.; ANDRADE, A. C.; ALMEIDA, I. C.; TRAVASSOS, L. R.; GAZZINELLI, R. T. Glycoconjugates isolated from *Trypanosoma cruzi* but not from *Leishmania* species membranes trigger nitric oxide synthesis as well as microbicidal activity in IFN-gamma-primed macrophages. **Journal of Immunology**. v.159: 6131-9, 1997.

CARIDHA, D., et al. Route map for the discovery and pre-clinical development of new drugs and treatments for cutaneous leishmaniasis. **IJP: Drugs and Drug Resistance**, 2019.

CARNEIRO, P.P.; CONCEIÇÃO, J.; MACEDO, M.; MAGALHÃES, V.; CARVALHO, E. M.; BACELLAR, O. The role of nitric oxide and reactive oxygen species in the killing of *Leishmania braziliensis* by monocytes from patients with cutaneous leishmaniasis. **Plos One**, 1-16, 2016.

CASTELLANO, L. R.; ARGIRO, L.; DESSEIN, H., DESSEIN, A.; DA SILVA, M. V.; CORREIA, D.; RODRIGUES, V. Use of interleukin-10 blockade as a therapeutic strategy in human cutaneous leishmaniasis. **Journal of Immunology Research**, 152741, 2015.

CASTRO, J. A.; MECA, M. M.; BARTEL, L. C. Toxic side effects of drugs used to treat Chagas' disease (American trypanosomiasis). **Human & Experimental Toxicology**, n.25, 2006.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. American Trypanosomiasis, 2019. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/dpdx/trypanosomiasisamerican/index.html>>

CHAGAS, C. Nova Tripanosomíase humana: Estudos sobre morfologia e o ciclo evolutivo do *Schizotrypanum cruzi*, n. gen., n. sp., agente etiológico da nova entidade mórbida do homem. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 1, p. 159-218, 1909.

CONTEH, L.; ENGELS, T.; MOLYNEUX, D. H. Socioeconomic aspects of neglected tropical diseases. **The Lancet**, [S.l.], v. 375, p. 239-247, jan. 2010.

COURA, J. R.; ABREU, L. L.; WILLCOX, H. P. F.; PETANA, W. Estudo comparativo controlado com emprego de benzonidazole, nifurtimox e placebo, na forma crônica da doença de Chagas, em uma área de campo com transmissão interrompida. Avaliação preliminar. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v.30, n.2, 1997.

COURA, J. R. Chagas disease: what is known and what is needed - A background article. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz** 102 (Supl. I): 113 -122, 2007.

COURA, J. R. The main sceneries of Chagas disease transmission. The vectors, blood and oral transmissions - A comprehensive review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 110, n. 3, p. 277-282, 2015.

COURA, J. R.; Tripanosomose, doença de Chagas. **Ciência e Cultura**. [online]., vol.55, n.1, pp.30-33., 2003.

CROFT, S. L. Monitoring drug resistance in Leishmaniasis. **Tropical Medicine International Health**, v. 6, p. 899-905, 2001.

CUNHA, G. M. A.; FONTENELE, J. B.; NOBRE-JÚNIOR, H. V.; MARTINS-DE-SOUZA, F. C.; SILVEIRA, E. R.; NOGUEIRA, N. A. P.; MORAES, M. O.; VIANA, G. S. B; COSTA-LOTUFO, L. V. Cytotoxic activity of chalcones isolated from *Lonchocarpus sericeus*. (Poir.) Kunth. **Phytotherapy Research**, v. 17: p.155–159, 2003.

CUNNINGHAM, A. C. Parasitic adaptive mechanisms in infection by *Leishmania*. **Experimental and Molecular Pathology**, 72(2):132-41, 2002.

DA SILVA, M. F.; ZAMPIERI, R. A.; MUXEL, S. M.; BEVERLEY, S. M.; FLOETERWINTER, L. M. *Leishmania amazonensis* arginase compartmentalization in the glycosome is important for parasite infectivity. **Plos One**, 7:e34022, 2012.

DA SILVA LANDIM, E. M. B. M.; RUIZ, A. L. T. G.; DE CARVALHO, J. E.; POMINI, A. M.; PASTORINI, L. H.; OLIVEIRA SANTIN, S. M. Antiproliferative activity and chemical constituents of *Lonchocarpus cultratus* (Fabaceae). **Natural Product Research**, 0, 1–4, 2019.

DA SILVA, S. S.; THOMÉ, G. da S.; CATANEO, A. H. D.; MIRANDA, M. M.; FELIPE, I.; ANDRADE, C. G. T. de J; CONCHON-COSTA, I. Brazilian Propolis Antileishmanial and Immunomodulatory Effects. **Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine**, 1–7, 2013.

DAVIES, L. C.; JENKINS, S. J.; ALLEN, J. E.; TAYLOR, P. R. Tissue-resident macrophages. **Nature immunology**, v. 14 (10), p. 986-995, 2013.

DECIT. Doenças negligenciadas: estratégias do Ministério da Saúde. **Revista de Saúde Pública**, v. 44, p. 200-2, 2010.

DE OLIVEIRA, C. I. and BRODSKYN, C. I. The immunobiology of *Leishmania braziliensis* infection. **Frontier in Immunology**, v. 3, pp. 1–9, 2012.

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

DIAS, J. C. P.; CLÁUDIO, L. D. G.; LIMA, M. M.; ALBAJAR-VIÑAS, P.; SILVA, R. A.; ALVES, R. V.; COSTA, V. M. Mudanças no paradigma da conduta clínica e terapêutica da doença de Chagas: avanços e perspectivas na busca da integralidade da saúde. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, n.25, p.87-90, 2016.

DIAS, J. C. P., et al. II Consenso Brasileiro em Doença de Chagas, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 25, n. esp, p. 7-86, 2016.

DIAS, J. C. P.; COURA, J. R. Clínica e terapêutica da doença de Chagas: uma abordagem prática para o clínico geral, Rio de Janeiro: Editora **Fiocruz**, 1997.

DIAS, L. C.; DESSOY, M. A. Doenças tropicais negligenciadas: uma nova era de desafios e oportunidades. **Química Nova**, Vol. 36, No. 10, 1552-1556, 2013.

DNDI. Drugs for Neglected Diseases initiative. Trypanosomiasis American. Disponível em: <<https://www.dndi.org/>>. Acesso em: 01 out. 2018.

ELISIA, I.; NAKAMURA, H.; LAM, V.; HOFES, E. et al. DMSO Represses Inflammatory Cytokine Production from Human Blood Cells and Reduces Autoimmune Arthritis. **Plos One**, v.11(3), 2016.

FERREIRA, A. M.; SABINO, E. C.; OLIVEIRA, L. C.; OLIVEIRA, C. D. L.; CARDOSO, C. S.; RIBEIRO, A. L. P.; HAIKAL, D. S. Benznidazole Use among Patients with Chronic Chagas' Cardiomyopathy in an Endemic Region of Brazil. **Plos One**, v.11, n.11, p.1-13, 2016.

FLORA FILHO, R.; ZILBERSTEIN, B. Óxido nítrico: o simples mensageiro percorrendo a complexidade. Metabolismo, síntese e funções. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v.46, n.3, p.265-271, 2000.

FONTENELE, J. B.; LEAL, L. K.; FELIX, F. H.; SILVEIRA, E. R. and VIANA, G. S. Studies on the anti-oedematogenic properties of a fraction rich in lonchocarpin and derricin isolated from *Lonchocarpus sericeus*. **Natural Product Research**. v.23, p.1677-1688, 2009.

FORSTERMANN, U.; SESSA, W. C. Nitric oxide synthases: regulation and function. **European Heart Journal**. v.33, p.829–837, 2012.

FOTI, L., et al. Viability study of a multiplex diagnostic platform for Chagas disease. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 104, supl. 1, p. 136-141, 2009.

FUCHINO, H.; KIUCHI, F.; YAMANAKA, A.; OBU, A.; WADA, H.; MORIYASUMOTO, K.; KAWAHARA, N.; FLORES, D.; PALACIOS, O.; SEKITA, S.; SATAKEG, M. New Leishmanicidal Stilbenes from a Peruvian Folk Medicine, *Lonchocarpus nicou*. **Chemical and Pharmaceutical Bulletin**, v.61, n.9, p.979–982, 2013.

FIOCRUZ. Fundação Oswaldo Cruz. Ministério da Saúde, Brasil. Brasília: Ilustrações: Castro Silva. Ilustrações publicadas em artigo de Carlos Chagas no primeiro volume das **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 2009. Disponível em: <<http://www.invivo.fiocruz.br/chagas/doen-ciclo-trypanosoma.html>>

GALVÃO, C.; CARVALHO, R. U.; ROCHA, D. S.; JUBERG, J. A check-list of the current valid species of the subfamily Triatominae Jeannel (Hemiptera, Reduviidae) and their geographical distribution, with nomenclatural and taxonomic notes. **Zootaxa**. v. 2002, p. 1-36, 2003.

GAZZINELLI, R. T.; DENKERS, E. Y. Protozoan encounters with Toll-like receptor signalling pathways: implications for host parasitism. **Nature Reviews Immunology**, v. 6, n. 12, p. 895-906, 2006.

GONÇALVES DE LIMA, O.; DE MÉLLO, J. F.; DE BARROS COELHO, J. S.; DE ANDRADE LYRA, F. D.; MACHADO DE ALBUQUERQUE, M.; MARINI-BETTÓLO, G. B.; DELLE MONACHE, G.; DELLE MONACHE, F. New prenylated chalcones from *Lonchocarpus neuroscapha* Benth. (*Cordia piaca*). **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v. 30, p. 326–42, 1975.

GRANJON, E.; DICHTEL-DANJOY, M.L.; SABA, E.; SABINO, E.; OLIVEIRA, L. C. d.; ZREIN, M. Development of a Novel Multiplex Immunoassay Multi-cruzi for the Serological Confirmation of Chagas Disease. **PLOS Neglected Tropical Diseases** 10(4): e0004596, 2016.

GREEN, L. C.; WAGNER, D. A.; GLOGOWSKI, J.; SKIPPER, P. L.; WISHNOK, J. S.; TANNENBAUM, S. R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analytical Biochemistry**, v. 126, p. 131-138, 1982.

GRIEBLER, A. Atividade anti-bacteriana e anti- *Trypanosoma cruzi* de extratos de sementes de *Lonchocarpus cultratus*. / Aline Griebler. — Cascavel, 2017. 85 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas; Universidade Estadual do Oeste do Paraná, Campus de Cascavel, 2017.

GUIMARÃES, D. A. S.; FARIA, A. R. Substâncias da natureza com atividade anti-*Trypanosoma cruzi*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**, v.17, 2007.

GYAPONG, J. O. *et al.* Integration of control of neglected tropical diseases into health-care systems: challenges and opportunities. **The Lancet**, [S.l.], v. 375, p. 160-165, jan. 2010.

HALLIWELL, B.; GUTTERIDGE, J. M. C. Oxygen toxicity, oxygen radicals, transition metals and disease. **Biochemical Journal**, v.219, p.1-14, 1984.

HOLM, A.; TEJLE, K.; GUNNARSSON, T.; MAGNUSSON, K. E.; DESCOTEAUX, A.; RASMUSSEN, B. Role of protein kinase C alpha for uptake of unopsonized prey and phagosomal maturation in macrophages. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, 302(4):653-8, 2003.

HON, W. M.; MOOCHHALA, S.; KHOO, H. E. Adenosine and its receptor agonists potentiate nitric oxide synthase expression induced by lipopolysaccharide in RAW 264.7 murine macrophages. **Life Sciences**, v. 60, p. 1327–1335, 1997.

IOSET, J. R.; MARSTON, A.; GUPTA, M. P.; HOSTETTMANN, K. Five New Prenylated Stilbenes from the Root Bark of *Lonchocarpus chiricanus*. **Journal of Natural Products**, v.64, p.710-715, 2001.

JEONG, Y. H.; PARK, J. S.; KIM, D. H.; KIM, H.S. Lonchocarpine Increases Nrf2/ARE-Mediated Antioxidant Enzyme Expression by Modulating AMPK and MAPK Signaling in Brain Astrocytes. **Biomolecules & therapeutics**, v. 24,6, 2016.

JEONG, Y. H.; PARK, J. S.; KIM, D. H.; KANG, J., L., KIM, H.S. Anti-inflammatory mechanism of lonchocarpine in LPS- or poly(I:C)-induced neuroinflammation. **Pharmacological Research**, v. 119, p. 431-442, 2017.

JUNQUEIRA, C.; CAETANO, B.; BARTHOLOMEU, D. C.; MELO, M. B.; ROPERT, C.; RODRIGUES, M. M.; GAZZINELLI, R. T. The endless race between *Trypanosoma cruzi* and host immunity: lessons for and beyond Chagas disease. **Expert Reviews in Molecular Medicine**, v. 12, 2010.

KAWASAKI, T.; KAWAI, T. Toll-Like Receptor Signaling Pathways. **Frontiers in Immunology**, v. 5, p. 1-8, 2014.

KIECHLE, F. L.; MALINSKI, T. Nitric oxide: Biochemistry, pathophysiology, and detection. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v.100, n.5, p. 567-573, 1993.

KIMA, P. E. The amastigote forms of *Leishmania* are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. **International Journal for Parasitology**, 37(10):1087-96, 2007.

KIRKLEY, S. A. Proposed mechanisms of transfusion induced immunomodulation. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**, v.6, n.5, p.652-657, 1999.

KANGUSSU-MARCOLINO, M. M.; DO ROSÁRIO, M. M. T.; NOSEDA, M. D.; DUARTE, M. E. R.; DUCATTI, D. R. B.; CASSOLATO, J. E. F., ... NOLETO, G. R. Acid heteropolysaccharides with potent antileishmanial effects. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 81. p 165–170, 2015.

KOOP, E.; MEDZHITOV, R. Recognition of microbial infection by Toll-like receptors. **Current Opinion in Immunology**, v. 15, p. 396-401, 2003.

KUMAR, R.; ENGWEDA, C. Vaccines to prevent leishmaniasis. **Clinical & Translational Immunology**, v. 3, p. e13, 2014.

KURSUN, E.; TURUNÇ, T.; DEMIROGLU, Y. Z.; SOLMAZ, S.; ARSLAN, H. Evaluation of fourteen adult cases with visceral leishmaniasis. **Mikrobiyol Bul**, 47(3):500-6, 2013.

LANA, M.; TAFURI, W. L. *Trypanosoma cruzi* e doença de Chagas. In: NEVES, D. P. **Parasitologia humana**, ed.10, Sao Paulo: Atheneu, 2000.

LAWRENCE, T., NATOLI, G. Transcriptional regulation of macrophage polarization: enabling diversity with identity. **Nature Reviews Immunology**. 11:750–61, 2011.

LAWSON, M. A.; KAOUADJI, M.; CHULIA, A. J. A single chalcone and additional rotenoids from *Lonchocarpus nicou*. **Tetrahedron Lett**. 51:6116–6119, 2010.

LAWSON, L. D.; BAUER, R. Phytochemicals of Europe: chemistry and biological activity. Washington: **American Chemical Society**, 1998. 324p.

LEAL, G. G. A.; ROATT, B. M.; AGUIAR-SOARES, R. D. O.; CARNEIRO, C. M.; et al. Immunological profile of resistance and susceptibility in naturally infected dogs by *Leishmania infantum*, **Veterinary Parasitology**, 205; 472–482, 2014.

LI, J.; JIANG, Z.; LI, X.; HOU, Y.; LIU, F.; LI, N.; LIU, X.; YANG, L. and CHEN, G. Natural therapeutic agents for neurodegenerative diseases from a traditional herbal medicine *Pongamia pinnata* (L.) Pierre. **Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters**, 25, 53-58, 2015.

LIESE, B.; ROSENBERG, M.; SCHRATZ, A. Programmes, partnership, and governance for elimination and control of neglected tropical diseases. **The Lancet**, [S.I.], v. 375, p. 67-76, jan. 2010.

LIMA, N. M.; ANDRADE, J. I.; LIMA, K. C.; DOS SANTOS, F. N.; BARISON, A.; SALOME, K. S.; MATSUURA, T. and NUNEZ, C. V. Chemical profile and biological activities of *Deguella duckeana* A.M.G. Azevedo (Fabaceae). **Natural Product Research**, 27, 425-432, 2013.

LIMA, É. R. DE et al. Avaliação da bioatividade do extrato etanólico e triterpeno lupano obtidos de *combretum leprosum* contra microorganismos. Revista Saber Científico, Porto Velho, v. 3, n. 1, p. 53–69, 2011.

LOK, H. C.; SAHNI, S.; JANSSON, P. J.; KOVACEVIC, Z.; HAWKINS, C. L.; RICHARDSON, D. R. A nitric oxide storage and transport system that protects activated macrophages from endogenous nitric oxide cytotoxicity. **Journal of Biological Chemistry**, v. 291(53):27042-61, 2016.

LLOBERAS, J; MODOLELL, M.; CELADA, A. L-Arginine and Macrophages: Role in Classical and Alternative Activation. **L-Arginine in Clinical Nutrition**. 117-129, 2016.

LOPES, F. C. M. Avaliação da atividade imunológica in vitro de *Alchornea spp* quanto à produção de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e fator de Necrose tumoral- α por macrófagos murinos. / Flávia Cristine Mascia Lopes – São Paulo, 2004. 146 f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista. “Júlio de Mesquita Filho”. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. Programa de Pós Graduação em Análises Clínicas.

LORENZI, H. Árvores brasileiras: manual de identificação e cultivo de plantas arbóreas nativas do Brasil, v.01, ed.4. **Nova Odessa: Instituto Plantarum**, 2002.

LOURDES, R. A. Aspectos parasitológicos, imunológicos e moleculares da resposta dependente do receptor do tipo *Toll* 9 na infecção experimental por cepas de diferentes linhagens de *Trypanosoma cruzi*. Rodrigo Almeida e Lourdes – Belo Horizonte, 2013. 154 f. Tese (Doutorado) – Programa de Pós-graduação em Parasitologia; Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas, 2013.

LU, Y.; ZHAO, W. Z.; CHANG, Z.; CHEN, W. X.; LI, L. Procyanidins from grape seeds protect against phorbol ester-induced oxidative cellular and genotoxic damage. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 25, p.1083-1089, 2004.

MACHADO, G. U.; PRATES, F. V.; MACHADO, P. R. L. Disseminated leishmaniasis: clinical, pathogenic, and therapeutic aspects. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. 94, 9–16, 2019.

MacMICKING, J.; QIAO-WEN XIE; NATHAN, C. Nitric oxide and macrophage function Annu. **Nature Reviews Immunology**, Palo Alto, v.15, p.323–350, 1997.

MAGALHÃES, A. F.; SANTOS, C. C.; MAGALHÃES, E. G.; NOGUEIRA, M. A. Detection of polyhydroxyalkaloids in *Lonchocarpus* extracts by GC-MS of acetylated derivatives. **Phytochemistry**. Anal., v.13, 2002.

MAGALHÃES, A. F.; TOZZI, A. M. A.; MAGALHÃES, E. G.; BLANCO, I. S.; NOGUEIRA, M. A. Three dibenzoylmethane derivatives from *Lonchocarpus* species. **Phytochemistry**. 46:1029–1033, 1997.

MAGALHÃES, A. F.; TOZZI, A. M. A.; NORONHA, B. H. L. S.; MAGALHÃES, E. G. Twenty-three flavonoids from *Lonchocarpus subglaucescens*. **Phytochemistry**. 42:1459–1471, 1996.

MAGALHÃES, A. F.; TOZZI, A. M.; MAGALHÃES, E. G.; NOGUEIRA, M. A.; QUEIROZ, S. C. Flavonoids from *Lonchocarpus latifolius* roots. **Phytochemistry**. 55:787–792, 2000.

MARIN-NETO, J. A.; SIMÕES, M. V.; SARABANDA, Á. V. L. Cardiopatia chagásica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**. 72, 247–263, 1999.

MARTINS-MELO, F. R.; RAMOS, A. N.; ALENCARA, C. H.; HEUKELBACHA, J. Prevalence of Chagas disease in Brazil: A systematic review and meta-analysis. **Acta Tropica**, v.130, p.67–174, 2014.

MARTINS-MELO, F.; ALENCAR, C. H.; RAMOS, A. N. J.; HEUKELBACH, J. Epidemiology of Mortality Related to Chaga's Disease in Brazil, 1997–2007. **PLOS Neglected Tropical Diseases**. 6(2):e1508, 2012.

MEIRA, C. S.; BARBOSA-FILHO, J. M.; LANFREDI-RANGEL, A.; GUIMARÃES, E. T.; MOREIRA, D. R. M.; SOARES, M. B. P. Antiparasitic evaluation of betulinic acid derivatives reveals effective and selective anti-*Trypanosoma cruzi* inhibitors. **Experimental Parasitology**, v. 166, p. 108–115, 2016.

MELLO, J. F.; MONACHE, F. D.; LIMA, O. G.; MARINI-BETTOLO, G. B.; MONACCHE, D. G.; LYRA, F. D. A.; ALBURQUERQUE, M. M. F.; D'ALBUQUERQUE, I. L. 4'-Hidroxi-2'-y, y-Dimetilaliloxi-chalcona e seus derivados naturais de *Lonchocarpus neuroscapha* Bentham (*Cordia piaca*). **Revista do Instituto de Antibióticos**, v.13, n.1-2, 1973.

MÉLLO, J. F.; LIMA, O. G.; ALBUQUERQUE, M. M.; MARINI-BETTÒLO, G. B.; LYRA, F. D.; SILVA, E. C. O and C prenylated chalcones with antineoplastic and antibiotic activities isolated from *Lonchocarpus neuroscapha* Benth. **Revista do Instituto de Antibióticos** (Recife), 14, 39–50, 1974.

MENICHINI, F.; DELLE MONACHE, F.; MARINI BETTOLO, G. Flavonoids and rotenoids from Tephrosieae and related tribes of Leguminosae. **Planta Medica**. 45, 243–244, 1982.

MONACHE, F. D.; SUAREZ, L. E.; BETTOLO, G. B. M. Flavonoids from the seeds of six *Lonchocarpus* species. **Phytochemistry**, v.17, 1978.

MOORE, K. W.; MALEFYT, R. W.; COFFMAN, R. L.; O'GARRA, A. Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. **Annual Review of Immunology**, v. 19, p. 683, 2001.

MORILLO, C. A.; MARIN-NETO, J. A.; AVEZUM, A.; SOSA-ESTANI, S.; RASSI, A.; et al. Randomized Trial of Benznidazole for Chronic Chagas' Cardiomyopathy. **New England Journal of Medicine**, 373, 1295–1306, 2015.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, p. 55-63, 1983.

MOSSER, D. M.; EDWARDS, J. P. Exploring the full spectrum of macrophage activation. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, p. 958–969, 2008.

MUÑOZ, J., et al. Prevalence and vertical transmission of *Trypanosoma cruzi* infection among pregnant Latin American women attending 2 maternity clinics in Barcelona, Spain. **Clinical Infectious Diseases**. 48:1736-40, 2009.

MUXEL, S. M.; AOKI, J. I.; FERNANDES, J. C. R.; LARANJEIRA-SILVA, M. F.; ZAMPIERI, R. A.; ACUÑA, S. M.; MULLER, K. E.; VANDERLINDE, R. H.; FLOETERWINTER, L. M. Arginine and polyamines fate in *Leishmania* infection. **Frontiers in Microbiology**. 8:2682, 2017.

NASCIMENTO, K. F. M1 homeopathic complex trigger effective responses against *Leishmania (L) amazonensis* in vivo and in vitro. **Cytokine**. 99 p. 80–90, 2017.

NATHAN, C. F.; HIBBS, J. B. Role of nitric oxide synthesis in macrophage antimicrobial activity. **Current Opinion Immunology**. 3:65– 70, 1991.

OPAS. Organização Pan Americana da Saúde. Guia para vigilância, prevenção, controle e manejo clínico da Doença de Chagas aguda transmitida por alimentos, 2009. Disponível em: <http://www.saude.rs.gov.br/upload/1335550488_Guia%20Para%20Vigil%C3%A2ncia,%20Preven%C3%A7%C3%A3o,%20Controle%20e%20Manejo.pdf> Acesso em: 30 de novembro de 2018.

ORYAN, A. Plant-derived compounds in treatment of leishmaniasis. **Iranian Journal of Veterinary Research**, v. 16, n. 1, p. 1–19, 2015.

OSORIO, E.; ARANGO, G. J.; JIMÉNEZ, N.; ALZATE, F.; RUIZ, G.; GUTIÉRREZ, D.; PACO, M. A.; GIMÉNEZ, A.; ROBLEDO, S. Antiprotozoal and cytotoxic activities in vitro of Colombian Annonaceae. **Journal of Ethnopharmacology**. 111, 630–635. 2007.

PAHO. Pan American Health Organization. Guidelines for the diagnosis and treatment of Chagas disease. Washington, D.C, 2019. Disponível em: <http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/49653/9789275120439_eng.pdf?sequence=6&isAllowed=y>

PAHO/WHO (Pan American Health Organization/World Health Organization). Información general: Leishmaniasis. Disponível em: <

https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=article&id=9417&Itemid=40250&lang=en. Acesso em: 10 ago. 2018.

PAHO/WHO (Pan American Health Organization/World Health Organization). Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas, n 6 – fev. 2018. Disponível em:

<http://iris.paho.org/xmlui/bitstream/handle/123456789/34857/LeishReport6_por.pdf?sequence=5&isAllowed=y> Acesso em 10 ago 2018.

PAHO/WHO. Pan American Health Organization/World Health Organization, 2017 Disponível

em:<http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_topics&view=article&id=10&Itemid=40743&lang=pt%20>. Acesso em: 01 out. 2018.

PINAZO, M. J., et al. Recommendations for management of Chagas disease in organs and hematopoietic tissue transplantation programs in nonendemic areas. **Transplantation Reviews** (Orlando);25:91-101, 2011.

PIRES, A. F.; RODRIGUES, N. V.; SOARES, P. M.; RIBEIRO, R. A.; ARAGÃO, K. S.; MARINHO, M. M.; DA SILVA, M. T.; CAVADA, B. S.; ASSREUY, A. M. A novel N-acetyl-glucosamine lectin of *Lonchocarpus araripensis* attenuates acute cellular inflammation in mice. **Inflammation Research** 1: 43-52, 2016.

PIRES, A. F. et al. Inhibitory effect of *Lonchocarpus araripensis* lectin in rat acute models of inflammation. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 91, n. 2, e 20180991, 2019.

PIZZO, C.; FARAL-TELLO, P.; SALINAS, G.; FLÓ, M.; ROBELLO, C.; WIPF, P.; MAHLER, G. S. Selenosemicarbazones as potent cruzipain inhibitors and their antiparasitic properties against *Trypanosoma cruzi*. **Medicinal Chemistry Communication**, v. 3, p. 362, 2012.

RASSI, A. Jr.; RASSI, A.; MARIN-NETO, J. A. Chagas disease. **Lancet**. 375(9723):1388–402, 2010.

RATES, S. M. K. Plants as source of drugs. **Toxicon**, v. 39, p. 603–613, 2001.

RATH, S. S.; TRIVELIN, L. A.; IMBRUNITO, T. R.; TOMAZELA, D. M.; JESÚS, M. N.; MARZAL, P. C.; ANDRADE-JUNIOR, H. F.; TEMPONE, A. G. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: estado da arte. **Química Nova**, v. 26, p. 550-5, 2003.

REYES-CHILPA, R.; BAGGIO, C. H.; ALAVEZ-SOLANO, D.; ESTRADA-MUNIZ, E.; KAUFFMAN, F. C.; SANCHEZ, R. I. and MESIA-VELA, S. Inhibition of gastric H⁺, K⁺-ATPase activity by flavonoids, coumarins and xanthenes isolated from Mexican medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**. 105, 167-172, 2006.

REY, L. Parasitologia: parasitos e doenças parasitárias do homem nas Américas e na África. Ed.3, Rio de Janeiro: **Guanabara Koogan**, 2001.

ROBERTS, S. C.; TANCER, M. J.; POLINSKY, M. R.; GIBSON, K. M.; HEBY, O.; ULLMAN, B. Arginase plays a pivotal role in polyamine precursor metabolism in

Leishmania. Characterization of gene deletion mutants. **Journal of Biological Chemistry**, 279:23668-23678, 2004.

ROSÁRIO, M. S.; OLIVEIRA, M. L.; LIMA, C. A.; VIEIRA, M. A.; CARNEIRO, J. A.; COSTA, F. M. Doenças tropicais negligenciadas: caracterização dos indivíduos afetados e sua distribuição espacial. **Revista Brasileira de Pesquisa em Ciências da Saúde**, Vitória, 19(3): 118-127, jul-set, 2017

ROSSOL, M.; HEINE, H.; MEUSCH, U.; QUANDT, D.; KLEIN, C.; SWEET, M. J.; HAUSCHILDT, S. LPS-induced cytokine production in human monocytes and macrophages. **Critical Reviews in Immunology**, v. 31, p. 379-446, 2011.

ROTTENBERG, M. E.; BAKHIET, M.; OLSSON, T.; KRISTENSSON, K.; MAK, T.; WIGZELL, H.; ORN, A. Differential susceptibilities of mice genomically deleted of CD4 and CD8 to infections with *Trypanosoma cruzi* or *Trypanosoma brucei*. **Infection and Immunity**, v. 61, n. 12, p. 5129-33, 1993.

ROWE, M. et al. An ImmunoSignature test distinguishes *Trypanosoma cruzi*, Hepatitis B, hepatitis C and West Nile vírus seropositivity among asymptomatic blood donors. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 11(9):e0005882, 2017.

SAHA, K.; LAJIS, N.; ISRAF, D.; HAMZAH, A.; KHOZIRAH, S.; KHAMIS, S.; SYAHIDA, A. Evaluation of antioxidant and nitric oxide inhibitory activities of selected Malaysian medicinal plants. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 92(2-3), p. 263–267. (2004).

SÁNCHEZ-GONZÁLEZ, G., et al. Cost-Effectiveness of Blood Donation Screening for *Trypanosoma cruzi* in Mexico. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 10(3): e0004528, 2016.

SANTIN, M. R.; SANTOS, A. O.; NAKAMURA, C. V.; FILHO, B. P. D.; FERREIRA, I. C. P.; UEDA-NAKAMURA, T. *In vitro* activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus* and its major componente (citral) on *Leishmania amazonensis*. **Parasitology Research**, v. 105, p. 1489-1496, 2009.

SATHLER-AVELAR, R.; VITELLI-AVELAR, D. M.; TEIXEIRA-CARVALHO, A.; MARTINS-FILHO, O. A. Innate immunity and regulatory T-cells in human Chagas disease: what must be understood? **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. 104 Suppl 1: 246-251, 2009.

SCOTT, P.; NOVAIS, F. O. Cutaneous leishmaniasis: immune responses in protection and pathogenesis. **Nature Reviews Immunology**, v. 16, p. 581-592, 2016.

SILVA, M. J.; TOZZI, A. M. G. A. Revisão Taxonômica de *Lonchocarpus* s. str (Leguminosae, Papilionoideae) do Brasil. **Acta Botanica Brasilica** v.26, n.2, 2012.

SOUZA, V. C. e LORENZI, H. Botânica sistemática: guia ilustrado para identificação das famílias de Fanerógamas nativas e exóticas no Brasil, baseado em APG III. Ed.3, **Nova Odessa**: Instituto Plantarum, 2012.

SHARMA, U.; SINGH, S. Immunobiology of leishmaniasis. **Indian Journal of Experimental Biology**, 47(6):412-23, 2009.

SUNDAR, S.; SINGH, A. Recent developments and future prospects in the treatment of visceral leishmaniasis. **Therapeutic Advances in Infectious Disease**, 3(3-4): 98-109, 2016.

TARLETON, R. L. Chagas Disease Impact and Opportunities: Beyond the Historical Dogma. In: Institute of Medicine (US) Forum on Microbial Threats. The Causes and Impacts of Neglected Tropical and Zoonotic Diseases: Opportunities for Integrated Intervention Strategies. Washington (DC): **National Academies Press** (US), 2011.

TELES, C. B. G et al. Activity of the Lupane isolated from *Combretum leprosum* against *Leishmania amazonensis* promastigotes. **Journal of the Brazilian Chemical Society**. Soc., São Paulo, v. 22, n. 5, p. 936-942, 2011.

TEJLE, K.; MAGNUSSON, K. E.; RASMUSSEN, B. Phagocytosis and phagosome maturation are regulated by calcium in J774 macrophages interacting with unopsonized prey. **Bioscience Reports**, 22(5-6):529-40, 2002.

TOMIOTTO-PELLISSIER, F.; BORTOLETI, B. T. d. S.; ASSOLINI, J. P.; GONÇALVES, M. D.; CARLOTO, A. C. M.; et al. Macrophage Polarization in Leishmaniasis: Broadening Horizons. **Frontiers in Immunology**, 9:2529, 2018.

TOMIOTTO-PELLISSIER, F., et al. *Caryocar coriaceum* extracts exert leishmanicidal effect acting in promastigote forms by apoptosis-like mechanism and intracellular amastigotes by Nrf2/HO-1/ferritin dependent response and iron depletion. **Biomedicine & Pharmacotherapy**. 98: 662–672, 2018.

TORRES-SANTOS, E. C., LOPES, D., RODRIGUES OLIVEIRA, R., CARAUTA, J. P. P., BANDEIRA FALCAO, C. A., KAPLAN, M. A. C., & ROSSI-BERGMANN, B. Antileishmanial activity of isolated triterpenoids from *Pourouma guianensis*. **Phytomedicine**, 11(2-3), 114–120, 2004.

VAN DEN BOSSCHE, J.; LAMERS, W. H.; KOEHLER, E. S., et al. Pivotal advance: arginase-1-independent polyamine production stimulates the expression of IL-4-induced alternatively activated macrophage markers while inhibiting LPS-induced expression of inflammatory genes. **Journal of Leukocyte Biology**, 91:685–99, 2012.

VASCONCELOS, R. S.; KOVALESKI, D. F.; JUNIOR, Z. C. T. Doenças Tropicais Negligenciadas: Revisão de Literatura Sobre As Intervenções Propostas. **Saúde & Transformação Social / Health & Social Chance**, vol. 6, n. 2, p. 114-131, 2015.

VILELA, M. Leishmaniose. **Instituto Oswaldo Cruz**, 2013. Disponível em: <<https://agencia.fiocruz.br/leishmaniose>>. Acesso em: 01 ago. 2018.

WALKER, D. M. et al. Mechanisms of cellular invasion by intracellular parasites. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 71, n. 7, p. 1245–1263, 13 abr. 2014.

WHO. World Health Organization. **Control and Prevention of Chagas disease in Europe – Report of a WHO Informal Consultation**. Geneva, 2009. Disponível em: <http://www.who.int/bloodproducts/ref_materials/WHO_Report_1st_Chagas_BRP_consultation_7-2007_final.pdf>. Acesso em: 05 mai. 2019.

WHO. World Health Organization. Expert Committee. **Control of Chagas disease**. World Health Organ Tech Rep Ser.; 905:i-vi, 1-109, 2002.

WHO. World Health Organization. Leishmaniasis **Fact sheet**, n. 375. April 2017. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>. Acesso em: 01 ago. 2018.

WHO - World Health Organization. **Fact sheet** n° 340. 2014. Chagas disease (American trypanosomiasis). Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs340/en/>. Acesso em: 02 de dezembro de 2018.

YAYLI, N.; UÇUNCU, O.; AYDIN, E.; YASAR, G.; YASAR, A.; BALTACI, C.; YLDIRIM, N.; KUÇUK, M. Stereoselective photochemistry of heteroaryl chalcones in solution and the antioxidant activities. **Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry**, v. 169, p. 229-234, 2005.

ZANLUQUI, N. G; WOWK, P. F.; PINGE-FILHO, P. Macrophage polarization in Chagas Disease. **Journal of Clinical & Cellular Immunology**, v. 6, n. 2, p. 1-6, 2015.

8. ANEXO



Certificado Experimental no Uso de Animais em Pesquisa Nº 47/17 - CEUA

Certificamos que a proposta intitulada "**Avaliação da atividade anti-*Trypanosoma cruzi* de extratos de *Lonchocarpus cultratus* em modelos experimentais *in vitro***", registrada com o número "29/16", sob a responsabilidade de "Rafael Andrade Menoll", que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo *Chordata*, subfilo *Vertebrata* (exceto humanos), para fins de pesquisa científica (ou ensino) – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pelo COMITÊ DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) DA UNIVERSIDADE ESTADUAL DO OESTE DO PARANÁ (UNIOESTE), em reunião de 18/08/2017.

Finalidade	Pesquisa Científica
Vigência da autorização	01/08/2016 - 31/07/2017
Espécie/linhagem/raça	Camundongo isogênico, Swiss
Nº de animais	298
Peso/idade	30g, 60 dias
Sexo	Feminino
Origem	Biotério UEM

Prof. Luciana Oliveira de Fariña
Coordenadora do CEUA UNIOESTE
Portaria nº3730/2016