

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA
FACULDADE DE MEDICINA
NÚCLEO DE MEDICINA TROPICAL

KELINE MEDEIROS DE ARAÚJO VILGES

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA PIPLARTINA E CINAMIDAS EM CULTIVOS
DE *Leishmania amazonensis*, *Plasmodium falciparum* E DE CÉLULAS
PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS SWISS**

BRASÍLIA
2018

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA PIPLARTINA E CINAMIDAS EM CULTIVOS
DE *Leishmania amazonensis*, *Plasmodium falciparum* E DE CÉLULAS
PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS SWISS**

KELINE MEDEIROS DE ARAÚJO VILGES

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical da Universidade de Brasília como requisito para obtenção do título de doutor em Medicina Tropical, na área de concentração: Biologia das doenças infecciosas e parasitárias (DIP), estudo de substâncias bioativas.

Orientadora: Selma Aparecida Souza Kuckelhaus

Co-orientador: José Roberto de Souza Almeida Leite



BRASÍLIA

2018

III. FICHA CATALOGRÁFICA

Vk29a Vilges, Keline Medeiros de Araújo
Avaliação do efeito da pipartina e cinamidas em cultivos de *Leishmania amazonensis*, *Plasmodium falciparum* e de células peritoneais de camundongos swiss / Keline Medeiros de Araújo Vilges; orientador Selma Aparecida Souza Kuckelhaus; co-orientador José Roberto de Souza Almeida Leite. -- Brasília, 2018.
174 p.

Tese (Doutorado - Doutorado em Medicina Tropical) -- Universidade de Brasília, 2018.

1. Malária. 2. Leishmaniose. 3. Pipartina/Piperlongumina. 4. Piperaceae. 5. Cinamidas. I. Kuckelhaus, Selma Aparecida Souza, orient. II. Leite, José Roberto de Souza Almeida, co-orient. III. Título.

IV. COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA

Keline Medeiros de Araújo Vilges

**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA PIPLARTINA E CINAMIDAS EM CULTIVOS
DE *Leishmania amazonensis*, *Plasmodium falciparum* E DE CÉLULAS
PERITONEAIS DE CAMUNDONGOS SWISS**

UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA

Medicina Tropical: Biologia das doenças infecciosas e parasitárias

DATA DA DEFESA DA TESE

20 de fevereiro de 2018

BANCA EXAMINADORA

Profª Drª Selma Aparecida Souza Kuckelhaus - Universidade de Brasília
(Presidente)

Dr. Carlos dos Santos Kuchelhaus - Secretaria da Saúde - DF

Profª Drª Doralina do Amaral Rabello Ramos - Universidade de Brasília

Profª Drª Lorena Carneiro Albernaz - Universidade de Brasília

Profª Drª Fabíola Cristina Ribeiro Zucche – Universidade de Brasília
(Suplente)

V. DEDICATÓRIA

Ao meu esposo Stefan Vilges de Oliveira, meu amor, amigo, companheiro e
incentivador.

VI. AGRADECIMENTOS

Á Deus por estar sempre ao meu lado, pelo cuidado e proteção durante toda trajetória percorrida.

Ao meu marido Stefan, meu amor, pelo cuidado, companheirismo, dedicação a nossa família, e pelas palavras de força e conforto.

Aos meus tios Daurianny e Inácio por terem me dado base para que eu pudesse chegar até aqui.

Á todos meus familiares que contribuíram indiretamente no meu trabalho.

Á minha orientadora Selma Aparecida pelos ensinamentos, determinação e incentivo.

Ao meu co-orientador José Roberto de Souza Almeida Leite, pela oportunidade, confiança e incentivo depositados em meu trabalho.

A professora Tatiana Borges pela contribuição nos ensaios de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico e apoptose celular e pelas orientações ao longo do trabalho desenvolvido.

Á estagiária Taynan Ribeiro pelo auxílio durante todos os ensaios realizados.

Aos técnicos dos laboratórios de Leishmanioses, Malária e Imunologia Celular, em especial à Renata Ribeiro, Mariângela e Shirley Claudino por estarem disponíveis a me auxiliar nos ensaios.

Ao professor da Universidade de São Paulo Massuo Kato e ao doutorando Harold pela síntese das amidas utilizadas nesse estudo.

VII. LISTAS DE FIGURAS, TABELAS E ABREVIações

FIGURAS

Figura 1. Estrutura química da piplartina, Fokoue (2015).

Figura 2. Estrutura geral dos análogos da piplartina, Fokoue (2015).

Figura 3. Células marcadas com Iodeto de propídio e Anexina V – FITC. Mostrando: Q2 (Apoptose tardia/necrose – An⁺PI⁺), Q3 (Célula viva – An⁻PI⁻) e Q4 (Apoptose inicial – An⁺PI⁻). Fonte: Cellsignal.com, adaptado.

Figura 4. Curva de crescimento de cultivos amastigotas de *L. amazonensis* a 37°C. As setas indicam o início das fases lag (1º dia), log ou exponencial (4º dia), estacionária inicial (6º dia) e de declínio (7º dia).

Figura 5. Efeito da piplartina em cultivos de macrófagos peritoneais de camundongos swiss (n=6) infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis*. Em A percentual de macrófagos infectados, em B média de leishmânias ingeridas por macrófagos e em C, índice de infecção. Os resultados foram avaliados pelo Teste t pareado. (*) valores considerados significativos quando comparados ao controle (p<0,05). Os dados estão representados em medianas, quartis valores máximos e mínimos.

Figura 6. Efeito da cinamida 5 em cultivos de macrófagos peritoneais de camundongos swiss (n=6) infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis*. Em A, percentual de macrófagos infectados, em B média de leishmânias ingeridas por macrófagos e em C, índice de infecção. Os resultados normais foram avaliados pelo Teste t pareado e os não normais

pelo teste de Wilcoxon. (*) valores considerados significativos quando comparados ao controle ($p < 0,05$). Os dados estão representados em medianas, quartis valores máximos e mínimos.

Figura 7. Fotomicrografia de macrófagos peritoneais infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com diferentes concentrações da piplartina e da cinamida 5. Macrófagos não infectados sem tratamento (A), macrófagos infectados sem tratamento (B), macrófagos infectados e tratados com 0,25 (C) ou 1 (D) ou 4 (E) ou 16 (F) ou 64 (G) $\mu\text{g/mL}$ da piplartina e macrófagos infectados e tratados com 0,25 (H) ou 1 (I) ou 4 (J) ou 16 (K) ou 64 (L) $\mu\text{g/mL}$ da cinamida 5. As células foram coradas com Giemsa a 10 %. Aumento 100x. A seta aponta para a leishmânia.

Figura 8. Efeito da piplartina (A) e da cinamida 5 (B) na aderência de macrófagos peritoneais de camundongos swiss, infectados ou não com *L. amazonensis* tratados ou não com diferentes concentrações (0,25, 1, 4, 16 e 64 $\mu\text{g/mL}$) da piplartina (A) e da cinamida 5 (B). (*) valores considerados significativos quando comparados ao controle (Teste t pareado; $p < 0,05$). Os dados estão representados em média e desvio padrão.

Figura 9. Efeito da piplartina (A) e da cinamida 5 (B) no percentual de aderência das células peritoneais de camundongos swiss. (*) valores considerados significativos quando comparados ao controle (Teste t pareado; $p < 0,05$). Os dados estão representados em média e desvio padrão.

Figura 10. Efeito das diferentes concentrações da piplartina sobre a indução de morte celular de macrófagos peritoneais de camundongos swiss infectados ou não com *L. amazonensis*. Em A percentual de células vivas, em apoptose inicial e em apoptose tardia/necrose avaliadas do sobrenadante dos cultivos. Em B percentual de células vivas, em apoptose inicial e em apoptose tardia/necrose que estavam aderidas sobre a placa de 96 escavações dos cultivos. Regressão Linear, valores considerados significativos quando $p < 0,05$.

Figura 11. Macrófagos peritoneais de camundongos swiss marcados ou não com anexina e iodeto de propídio, que estavam no sobrenadante dos cultivos, infectados ou não com *L. amazonensis* e tratados com diferentes concentrações (0,25; 1; 4; 16 e 64 µg/mL) da piplartina. Controle basal (A), Controle leishmânia (B), Controle DMSO (C), Controle H₂O₂ (D), 0,25 µg/mL (E), 1 µg/mL (F), 4 µg/mL (G), 16 µg/mL (H) e 64 µg/mL (I). Q2 (Apoptose tardia/necrose - An⁺PI⁺), Q3 (Célula viva - An⁻PI⁻) e Q4 (Apoptose inicial - An⁺PI⁻), por citometria de fluxo.

Figura 12. Macrófagos peritoneais de camundongos swiss marcados ou não com anexina e iodeto de propídio, que estavam aderidos sobre a placa de 96 escavações, infectados ou não com *L. amazonensis* e tratados com diferentes concentrações (0,25; 1; 4; 16 e 64 µg/mL) da piplartina. Controle basal (A), Controle leishmânia (B), Controle DMSO (C), Controle H₂O₂ (D), 0,25 µg/mL (E), 1 µg/mL (F), 4 µg/mL (G), 16 µg/mL (H) e 64 µg/mL (I). Q2 (Apoptose tardia/necrose - An⁺PI⁺), Q3 (Célula viva - An⁻PI⁻) e Q4 (Apoptose inicial - An⁺PI⁻), por citometria de fluxo.

Figura 13. Efeito das diferentes concentrações cinamida 5 sobre a indução de morte celular de macrófagos peritoneais de camundongos swiss infectados ou não com *L. amazonensis*. Em A percentual de células vivas, em apoptose inicial e em apoptose tardia/necrose avaliadas do sobrenadante dos cultivos. Em B percentual de células vivas, em apoptose inicial e em apoptose tardia/necrose que estavam aderidas sobre a placa de 96 escavações dos cultivos. Regressão Linear, valores considerados significativos quando p<0,05.

Figura 14. Macrófagos peritoneais de camundongos swiss marcados ou não com anexina e iodeto de propídio, que estavam no sobrenadante dos cultivos, infectados ou não com *L. amazonensis* e tratados com diferentes concentrações (0,25; 1; 4; 16 e 64 µg/mL) da cinamida 5. Controle basal (A), Controle leishmânia (B), Controle DMSO (C), Controle H₂O₂ (D), 0,25

µg/mL (E), 1 µg/mL (F), 4 µg/mL (G), 16 µg/mL (H) e 64 µg/mL (I). Q2 (Apoptose tardia/necrose - An⁺PI⁺), Q3 (Célula viva - An⁻PI⁻) e Q4 (Apoptose inicial - An⁺PI⁻), por citometria de fluxo.

Figura 15. Macrófagos peritoneais de camundongos swiss marcados ou não com anexina e iodeto de propídio, que estavam aderidos sobre a placa de 96 escavações, infectados ou não com *L. amazonensis* e tratados com diferentes concentrações (0,25; 1; 4; 16 e 64 µg/mL) da cinamida 5. Controle basal (A), Controle leishmânia (B), Controle DMSO (C), Controle H₂O₂ (D), 0,25 µg/mL (E), 1 µg/mL (F), 4 µg/mL (G), 16 µg/mL (H) e 64 µg/mL (I). Q2 (Apoptose tardia/necrose - An⁺PI⁺), Q3 (Célula viva - An⁻PI⁻) e Q4 (Apoptose inicial - An⁺PI⁻), por citometria de fluxo.

Figura 16. Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos swiss (n=6) infectados ou não com *L. amazonensis* e tratados ou não com diferentes concentrações (0,25; 1; 4; 16 e 64 µg/mL) da piplartina (A) e da cinamida 5 (B). Os resultados foram analisados pelo teste Wilcoxon, considerando os valores significativos quando p<0,05. Os dados estão representados em medianas, quartis valores máximos e mínimos. (•) Representa a amostra com variabilidade, avaliada pelo teste de Tukey.

Figura 17. Produção de nitrito por macrófagos peritoneais de camundongos swiss (n=6) infectados ou não com *L. amazonensis* e tratados ou não com diferentes concentrações (0,25; 1; 4; 16 e 64 µg/mL) da piplartina (A) e da cinamida 5 (B). Os resultados foram analisados pelo teste Wilcoxon, considerando os valores significativos quando p<0,05. Os dados estão representados em medianas, quartis valores máximos e mínimos.

Figura 18. Efeito da piplartina na formação de corpúsculos lipídicos em cultivos de macrófagos peritoneais de camundongos swiss infectados ou não com *L. amazonensis*. Em A, % de macrófagos com corpúsculos lipídicos, em B, média de corpúsculos lipídicos por macrófagos e em C, índice corpuscular. (┆) valores considerados significativos quando comparados

ao controle macrófago infectado com leishmânia (Anova seguido por Student Newman-Keuls, $p < 0,05$). Os dados estão representados em média e desvio padrão.

Figura 19. Efeito da cinamida 5 na formação de corpúsculos lipídicos em cultivos de macrófagos peritoneais de camundongos swiss ($n=6$) infectados ou não com *L. amazonensis*. Em A, % de macrófagos com corpúsculos lipídicos, em B, média de corpúsculos lipídicos por macrófagos e em C, índice corpuscular. (—) valores considerados significativos quando comparados com o controle macrófago infectado com leishmânia (Mac leish) (Anova seguido por Student Newman-Keuls, $p < 0,05$). Os dados estão representados em média e desvio padrão.

Figura 20. Fotomicrografia de macrófagos peritoneais de camundongos swiss infectados ou não com formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com diferentes concentrações da piplartina e da cinamida 5, corados com óleo vermelho para demonstrar a presença ou não de corpúsculos lipídicos. Aumento 100x. A seta aponta para os corpúsculos lipídicos.

TABELAS

Tabela 1. Estrutura química da piplartina (1) e das cinamidas 2, 3, 4 e 5.

Tabela 2. Percentual de eritrócitos infectados por *P. falciparum* depois de 48 ou 72 horas de incubação com diferentes concentrações da piplartina (1) e das cinamidas 2, 3, 4 e 5.

Tabela 3. Percentual de formas promastigotas viáveis de *L. amazonensis* depois de 6 h de incubação com diferentes concentrações das amidas.

Tabela 4. Percentual de células peritoneais viáveis depois de 6 h de incubação com diferentes concentrações das amidas.

Tabela 5. Percentual de células peritoneais viáveis depois de 4 h de incubação com diferentes concentrações das amidas.

Tabela 6. Índice de seletividade dos compostos 1, 2, 3, 4, e 5 para as formas promastigotas de *L. amazonensis* e para as formas intraeritrocitárias de *P. falciparum* (48 ou 72 horas de incubação).

Tabela 7. Percentual de viabilidade das formas amastigotas de *L. amazonensis* depois da incubação com diferentes concentrações das amidas 1 e 5.

Tabela 8. Percentual de viabilidade das formas amastigotas de *L. amazonensis* depois da incubação com diferentes concentrações das amidas 1 e 5.

Tabela 9. Efeito microbicida em *P. falciparum* e *L. amazonensis*, e citotóxico em células peritoneais.

Tabela 10. Efeito imunomodulador da piplartina (1) e cinamida 5 sobre a adesão celular, sobre a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, sobre a produção de corpúsculos lipídicos e sobre a indução de morte por apoptose inicial e/ou apoptose tardia/necrose das células peritoneais infectadas ou não com *L. amazonensis*.

ABREVIATURAS E SIGLAS

DMSO: Dimetilsulfóxido

IC₅₀: Concentração Inibitória 50%

CC₅₀: Concentração citotóxica 50%

H₂O₂: Peróxido de hidrogênio

IS: Índice de Seletividade

IL: Interleucina

IFN- γ : Interferon gamma

L. (L.): *Leishmania (Leishmania)*

L. (V.): *Leishmania (Viannia)*

LCL: Leishmaniose Cutânea Localizada

LCM: Leishmaniose Cutâneo Mucosa

LCD: Leishmaniose Cutâneo Difusa

LD: Leishmaniose Disseminada

LTA: Leishmaniose Tegumentar Americana

LV: Leishmaniose Visceral

LPS: Lipopolissacarídeo

LPG: Lipofosfoglicano

MTT: Brometo 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazol

NO: Nitric Oxide, em inglês (Óxido nítrico)

NK: Natural Killer, em inglês (Citotóxica Natural)

PMA: Acetato de Forbol Miristato

RPMI: Meio de Cultura ("Roswell Park Memorial Institute")

SFB: Soro Fetal Bovino

SDS : Sodium dodecyl sulfate

Ta 1: Linfócito T auxiliar do tipo 1

Ta 2: Linfócito T auxiliar do tipo 2

TCD4: Linfócito TCD4

TCD8: Linfócito T CD8

TNF - α : Fator de Necrose Tumoral Alfa

VIII. FINANCIAMENTO

Este trabalho foi financiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES). A Fundação de Apoio à Pesquisa do Distrito Federal (FAP – DF) e o Departamento de Pós-graduação concederam auxílios para a participação em Congressos Científicos Nacionais e Internacionais.

IX. ÍNDICE

X.	RESUMO	22
X.	ABSTRACT	24
1.0.	INTRODUÇÃO	26
1.1.	Leishmanioses	27
1.2.	Ciclo biológico: <i>Leishmania</i> sp.	28
1.3.	Aspectos imunológicos e clínicos das leishmanioses	29
1.4.	Aspectos gerais dos corpúsculos lipídicos e sua relação com <i>Leishmania</i> sp.	32
1.5.	Tratamento das leishmanioses	34
1.6.	Malária	35
1.7.	Ciclo biológico: <i>Plasmodium</i> sp.	35
1.8.	Aspectos clínicos e imunológicos da malária	36
1.9.	Tratamento da malária	37
1.10.	Aspectos gerais da apoptose e sua relação com as infecções parasitárias	38
1.11.	Plantas medicinais	40
1.12.	Amidas/cinamidas sintetizadas para este estudo tendo a piplartina como modelo	42
2.0.	OBJETIVOS	45

2.1.	Primeiro objetivo geral	46
2.2.	Segundo objetivo geral	46
3.0.	MATERIAIS E MÉTODOS	47
3.1.	Delineamento experimental	48
3.2.	Piplartina e cinamidas	49
3.3.	Micro-organismos	52
A	<i>L. amazonensis</i>	52
B	<i>P. falciparum</i>	53
3.4.	Animais	53
3.5.	Determinação <i>in vitro</i> da dose tóxica da piplartina (1) e das cinamidas (2 - 5) sobre <i>P. falciparum</i>	53
3.6.	Determinação do efeito da piplartina (1) e das cinamidas (2 - 5) em cultivos promastigotas de <i>L. amazonensis</i> pelo método MTT	54
3.7.	Obtenção e quantificação das células peritoneais dos camundongos Swiss	55
3.8.	Determinação da dose tóxica da piplartina (1) e cinamidas (2 - 5) em células peritoneais de camundongos pelo método MTT	55
3.9.	Determinação da dose tóxica da piplartina (1) e da cinamida 5 em células peritoneais de camundongos pela coloração com nigrosina	56

3.10.	Índice de Seletividade	56
3.11.	Curva de crescimento para cultivos amastigotas axênicas de <i>L. amazonensis</i>	57
3.12.	Determinação do efeito da piplartina (1) e da cinamida 5 em cultivos amastigotas axênicas de <i>L. amazonensis</i> pelo método MTT	57
3.13.	Determinação do efeito da piplartina (1) e da cinamida 5 em cultivos amastigotas axênicas de <i>L. amazonensis</i> pela coloração com nigrosina	58
3.14.	Avaliação do efeito microbicida e de aderência da piplartina (1) e da cinamida 5 em macrófagos infectados ou não com formas amastigotas axênicas de <i>L. amazonensis</i>	59
3.15.	Avaliação do efeito da piplartina (1) e da cinamida 5 na aderência das células peritoneais dos camundongos	60
3.16.	Efeito da piplartina e da cinamida 5 sobre a indução de morte celular em macrófagos peritoneais infectados ou não por <i>Leishmania</i> – Marcação e análise das células com Anexina e Iodeto de Propídio	60
3.17.	Quantificação de peróxido de hidrogênio (H ₂ O ₂) em cultivos de macrófagos peritoneais de camundongos infectados ou não por <i>Leishmania</i> e tratados com diferentes concentrações da piplartina (1) e da cinamida 5	62

3.18.	Quantificação de óxido nítrico em cultivos de macrófagos peritoneais de camundongos infectados ou não por <i>Leishmania</i> e tratados com diferentes concentrações da piplartina (1) e da cinamida 5	63
3.19.	Efeito da piplartina (1) e da cinamida 5 sobre a formação de corpúsculos lipídicos por macrófagos infectados ou não por <i>Leishmania</i> - Marcação citoquímica com óleo vermelho (Oil-Red)	64
3.20.	Análise estatística	65
4.0.	RESULTADOS	67
4.1.	Determinação <i>in vitro</i> da dose tóxica da piplartina (1) e das cinamidas 2 - 5 sobre <i>P. falciparum</i>	68
4.2.	Determinação do efeito da piplartina (1) e cinamidas 2 - 5 em cultivos promastigotas de <i>L. amazonensis</i> pelo método MTT	70
4.3.	Determinação da dose tóxica da piplartina (1) e cinamidas 2 - 5 em células peritoneais de camundongos pelo método MTT e determinação da dose tóxica da piplartina (1) e da cinamida 5 em células peritoneais de camundongos pela coloração com nigrosina	72
4.4.	Índice de seletividade	74
4.5.	Curva de crescimento para cultivos amastigotas axênicas de <i>L. amazonensis</i>	75
4.6.	Determinação do efeito da piplartina (1) e da cinamida 5 em cultivos amastigotas axênicas de <i>L. amazonensis</i> pelo método MTT e pela coloração com nigrosina	76

4.7.	Avaliação do efeito microbicida da piplartina (1) e da cinamida 5 em macrófagos infectados ou não com formas amastigotas axênicas de <i>L. amazonensis</i>	78
4.8.	Avaliação do efeito da piplartina (1) e da cinamida 5 na aderência dos macrófagos peritoneais infectados ou não com <i>L. amazonensis</i>	83
4.9.	Avaliação do efeito da piplartina (1) e da cinamida 5 na aderência das células peritoneais dos camundongos Swiss	85
4.10.	Efeito da piplartina sobre a indução da morte celular em macrófagos peritoneais infectados ou não por <i>Leishmania</i>	87
4.11.	Efeito da cinamida 5 sobre a indução da morte celular em macrófagos peritoneais infectados ou não por <i>Leishmania</i>	92
4.12.	Quantificação de peróxido de hidrogênio em cultivos de macrófagos peritoneais de camundongos infectados ou não com <i>L. amazonensis</i>	97
4.13.	Quantificação de óxido nítrico em cultivos de macrófagos peritoneais de camundongos infectados ou não com <i>L. amazonensis</i>	99
4.14.	Efeito da piplartina (1) e da cinamida 5 sobre a formação de corpúsculos lipídicos por macrófagos infectados ou não por <i>Leishmania</i>	101

4.15.	Sumário dos Resultados	106
5.0.	DISCUSSÃO	108
5.1.	Considerações sobre o efeito anti-protozoa e o índice de seletividade	109
5.2.	Considerações sobre a funcionalidade dos macrófagos na presença ou ausência da infecção	114
A.	Efeito microbicida	114
B.	Expressão de receptores para a aderência celular e indução de morte celular	115
C.	Produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio	118
D.	Formação de corpúsculos lipídicos	119
6.0.	CONCLUSÃO	121
7.0.	LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS	125
8.0.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	128
	ANEXO I (Parecer do Comitê de Ética)	144
	ANEXO II (Artigo científico publicado em 17 de abril de 2017)	146
	ANEXO III (Meios e Reagentes)	149
	ANEXO IV (Tabelas)	155

X. RESUMO

As leishmanioses e a malária são consideradas um problema de saúde pública no mundo. A piplartina é uma amida obtida da espécie *Piper tuberculatum* (Piperaceae) que tem se mostrado promissora em testes antiparasitários, por isso, vem sendo utilizada como base para síntese de novas moléculas. O objetivo desse trabalho foi avaliar o efeito da piplartina (1) e cinamidas (2, 3, 4 e 5), *in vitro*, em *Leishmania amazonensis* e *Plasmodium falciparum*, bem como sobre as funções das células/macrófagos peritoneais de camundongos swiss. Assim, cultivos de *L. amazonensis*, eritrócitos humanos com *P. falciparum* e células peritoneais de camundongos foram incubados com diferentes concentrações de 1, 2, 3, 4 e 5 e avaliados pelos métodos MTT, coloração com nigrosina e/ou coloração com giemsa. As funções celulares como 1) aderência e capacidade microbicida, 2) produção de peróxido de hidrogênio, 3) produção de óxido nítrico, 4) formação de corpúsculos lipídicos e 5) indução de morte celular, foram avaliadas por coloração com giemsa e com contagem das células em microscopia óptica; marcação com tetramethylbenzidine e peroxidase tipo II; reagente de Greiss; oil red; e pela marcação com anexina e iodeto de propídio, respectivamente, tratadas com 1 e 5. Os resultados da redução do MTT (*L. amazonensis* ou células peritoneais) e da parasitemia por microscopia (*P. falciparum*) mostraram que a piplartina (1) e as cinamidas (2, 3, 4 e 5) inibiram o crescimento dos protozoários, sendo a 5 mais ativa contra *Leishmania* sp. e a 1 contra *Plasmodium* sp. e nos cultivos de células peritoneais a média \pm DP para o CC_{50} foi de $294,4 \pm 85,7$. Além dos resultados de redução do MTT, houve uma diminuição da viabilidade para os cultivos de *L. amazonensis* e para as células peritoneais pela coloração com nigrosina. A piplartina (1) e a cinamida 5 reduziram a média \pm DP do percentual de células peritoneais aderidas sobre as lamínulas em relação ao

controle não tratado. Para as demais funções celulares foi observada uma diminuição do índice de infecção dos macrófagos infectados e uma modulação do sistema imune, pela diminuição da adesão dos macrófagos peritoneais infectados, pela influência na produção de peróxido de hidrogênio, óxido nítrico, corpúsculos lipídicos em macrófagos infectados e, especificamente, a cinamida 5, pela diminuição do percentual de células viáveis que estavam aderidas sobre a placa, e pela tendência a causar um aumento do percentual de células em apoptose inicial, e aumento no percentual de células em apoptose tardia/necrose. Nossos resultados mostraram a potencialidade das amidas 1 e 5 no tratamento da malária e da leishmaniose e sugerem a continuidade dos estudos pré-clínicos para avaliar seus efeitos *in vivo*.

Palavras - chave: Malária; Leishmaniose; Piplartina/Piperlongumina; Piperaceae; Cinamidas.

X. ABSTRACT

Leishmaniasis and malaria are considered a public health problem in the world. Piplartine is an amide obtained from the *Piper tuberculatum* specie (Piperaceae), which has been shown to be promising in antiparasitic tests, and has been used as a basis for the synthesis of new molecules. The objective of this work was to evaluate the effect of piplartine (1) and cinnamides (2, 3, 4 and 5) *in vitro* on *Leishmania amazonensis* and *Plasmodium falciparum*, as well as on the functions of the peritoneal cells/macrophages of swiss mice. Thus, cultures of *L. amazonensis*, human erythrocytes with *P. falciparum* and peritoneal cells of mice were incubated with different concentrations of 1, 2, 3, 4 and 5 and evaluated by MTT, nigrosin staining and/or giemsa staining. Cellular functions such as 1) adhesion and microbicidal capacity, 2) production of hydrogen peroxide, 3) production of nitric oxide, 4) formation of lipid bodies and 5) induction of cell death were evaluated by staining with giemsa and counting the cells in optical microscopy; labeling with tetramethylbenzidine and peroxidase type II; Greiss's reagent; oil red; and by labeling with annexin and propidium iodide, respectively, treated with 1 and 5. The results of the reduction of MTT (*L. amazonensis* or peritoneal cells) and parasitemia by microscopy (*P. falciparum*) showed that piplartine (1) and cinnamides (2, 3, 4 and 5) inhibited protozoa growth, and 5 was more active against *Leishmania* sp. and 1 against *Plasmodium* sp. and in cultures of peritoneal cells the mean \pm SD for CC₅₀ was 294.4 \pm 85.7. In addition to the MTT reduction results, there was a decrease in viability for *L. amazonensis* cultures and for peritoneal cells by nigrosin staining. Piplartine (1) and cinnamide 5 reduced the mean \pm SD of the percentage of peritoneal cells adhered to the coverslips compared to the untreated control. For the other cellular functions, a decrease in the infection rate of the infected macrophages and a modulation of the immune system

were observed, due to the decrease in the adhesion of infected peritoneal macrophages, the influence on the production of hydrogen peroxide, nitric oxide, lipid corpuscles in infected macrophages and, specifically cinnamide 5, by decreasing the percentage of viable cells that were adhered to the plaque, and by the tendency to cause an increase in the percentage of cells in initial apoptosis, and increase in the percentage of cells in late apoptosis/necrosis. Our results showed the potential of amides 1 and 5 in the treatment of malaria and leishmaniasis and suggest the continuity of preclinical studies to evaluate their effects *in vivo*.

Keywords: Malaria; Leishmaniasis; Piplartine / Piperlongumine; Piperaceae; Cinnamides.

1. INTRODUÇÃO

1.1. Leishmanioses

A *Leishmania* é um protozoário membro do filo Protozoa, subfilo Sarcomastigophora, classe Mastigophora, ordem Kinetoplastida, família Trypanosomatidae e gênero *Leishmania* (Coura, 2013). Os parasitas pertencentes a esse gênero são causadores das leishmanioses, doenças endêmicas em 88 países do mundo, dos quais 72 são em desenvolvimento, (Cavalcante e Vale, 2014).

A imunopatogenênese da leishmaniose é dependente de fatores intrínsecos ao hospedeiro, como o perfil imunogenético, e da especificidade antigênica de *Leishmania sp.* (Soong, 2008). Um amplo espectro de manifestações clínicas pode ser observado: Leishmaniose Cutânea Localizada (LCL), Leishmaniose Cutâneo Mucosa (LCM), Leishmaniose Cutâneo Difusa (LCD) e Leishmaniose Disseminada (LD), todas variantes da Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Além da LTA, pode ser citada também a Leishmaniose Visceral (LV) (Vieira et al., 2013).

No Brasil, a LTA encontra-se amplamente distribuída, apresentando registro de casos autóctones em todos os estados da federação (Dorval et al., 2006). De acordo com a Secretaria de Vigilância e Saúde do Brasil, foram confirmados 12.690 casos em 2016. Algumas espécies de *Leishmania* responsáveis pela LTA já foram descritas no país, sendo seis do subgênero *Viannia* e uma do subgênero *Leishmania*: *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (V.) brasiliensis*, *L. (V.) lainsoni*, *L. (V.) naiffi*, *L. (V.) lindeberg* e *L. (V.) shawi*, no entanto, as três principais espécies são *L. (L.) amazonensis*, *L. (V.) guyanensis* e *L. (V.) brasiliensis* (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2017). Os vetores são insetos flebotomíneos, pertencentes ao gênero *Lutzomyia*, popularmente conhecidos como mosquito palha, tatuquira, birigui, entre outros (Almeida e Santos, 2011). As principais espécies envolvidas na transmissão da LTA no Brasil são *L. whitmani*, *L. intermedia*, *L. umbratilis*, *L. wellcomei*, *L. flaviscutellata*, e *L. migonei* (Gontijo e Carvalho, 2003).

Já a LV é causada por parasitos pertencentes ao subgênero *Leishmania*, com três espécies principais: *Leishmania (L.) donovani*, *L. (L.) infantum*, *L. (L.) chagasi* – agrupadas no complexo *L. donovani* (Melo, 2004). Em 2016, foram confirmados 3.200 casos no Brasil, tendo como agente etiológico *L. (L.) chagasi* (Secretaria de Vigilância em Saúde, 2017; Caldart et al., 2017). O principal vetor envolvido na transmissão da LV no Brasil é o *Lutzomyia longipalpis* (Silva et al., 2007).

1.2. Ciclo biológico: *Leishmania* sp.

O gênero *Leishmania* engloba protozoários parasitas com ciclo de vida heteroxênico, apresentam duas formas principais: a promastigota, presente no tubo digestivo do inseto vetor, e outra amastigota, presente nos tecidos dos hospedeiros mamíferos (Bates, 2007). Os insetos vetores são responsáveis pela transmissão do parasita de um mamífero para outro (Gontijo e Carvalho, 2003). Os mamíferos portadores da *Leishmania* sp. são geralmente animais silvestres como a preguiça, o tamanduá, roedores, raposas dentre outros. No Brasil, o mais importante reservatório animal é o cão e a raposa (Rath et al., 2003).

As fêmeas de flebotomíneos se infectam ao realizarem um repasto sanguíneo no hospedeiro reservatório, ingerindo as formas amastigotas que se encontram nos tecidos desses vertebrados. No trato digestório do inseto vetor, as amastigotas passam por um processo de diferenciação, mudando para a forma promastigota procíclica, e aproximadamente após cinco dias no intestino médio, os parasitos se desenvolvem em promastigotas metacíclicas, tornando-se infectantes para o hospedeiro vertebrado (Almeida, 2006; Grimaldi e Tesh, 1993). Essas formas infectantes são inoculadas no hospedeiro, fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear e por neutrófilos atraídos para a região onde houve a inoculação devido a resposta inflamatória desenvolvida (Rasmusson e Descoteaux, 2004). As formas promastigotas metacíclicas se diferenciam em amastigotas no interior das células fagocíticas, se multiplicam até a ruptura

celular, onde infectam novas células e novos vetores, mantendo o ciclo com o vetor e com o hospedeiro (Peters et al., 2008).

Em relação aos ensaios que são feitos *in vitro*, na triagem inicial de agentes leishmanicidas, normalmente se utilizam as formas promastigotas devido a simplicidade de cultivo (Fumarola et al., 2004). Estas formas crescem em diversos meios de cultura, tais como: Novy McNeal Nicolle – NNN, Schneider® e RPMI 1640 suplementados com soro fetal bovino inativado, em temperatura ambiente variando entre 24 a 26 °C (Gontijo e Carvalho, 2003; Moreira et al., 2007; Gutierrez et al., 2010). As formas amastigotas crescem em meios semelhantes, porém devem ser mantidas em temperatura de 37 °C (Aquino, 2014). A fim de evitar a contaminação das culturas com bactérias são adicionados aos meios de crescimento antibióticos, como, benzilpenicilina, estreptomicina e gentamicina, sendo que a concentração destes não está padronizada na literatura (Aquino, 2014; Melo, 2010). O uso de antifúngicos deve ser evitado, pois se supõe que causem danos a *Leishmania* sp., que são organismos eucariontes (Palomino et al., 1983). Além disso, é possível avaliar em qual fase o parasito se encontra na cultura, pela observação de seu crescimento em função do tempo. Há quatro fases descritas: 1) Lag, 2) Log ou exponencial, 3) Estacionária e 4) Declínio. Na primeira, pouca ou nenhuma divisão é observada; na segunda, as células começam a se dividir ativamente; na terceira, a velocidade da reprodução é reduzida e a população se torna estável; e por fim, na quarta, o número de células mortas excede o número de células vivas. A causa da interrupção do crescimento exponencial pode estar relacionada ao esgotamento de nutrientes e as alterações do pH (Tortora et al., 2012).

1.3. Aspectos imunológicos e clínicos das leishmanioses

A imunidade antileishmania é mediada pela resposta imune inata e adaptativa (Liese et al., 2008). A presença das formas promastigotas metacíclicas no hospedeiro vertebrado gera uma resposta inflamatória

aguda inespecífica no local da inoculação, onde participam neutrófilos, macrófagos, células *natural killer* (NK), e ainda, proteínas do sistema complemento (Pires et al., 2012). Os neutrófilos têm importante papel na imunidade antileishmania, uma vez que são as primeiras células a chegarem no sítio da infecção, podendo atuar no controle ou aumento desta, sendo essa atuação dependente do perfil da resposta do hospedeiro e da espécie do parasita envolvida (Conceição, 2014). No que se refere ao controle da infecção, essas células podem exercer sua atividade microbicida pela ação de enzimas proteolíticas e espécies reativas de oxigênio e, ainda, produzir citocinas que contribuirão para o recrutamento de outras células mais especializadas, incluindo as células dendríticas (Carlsen et al., 2015). Em contrapartida, estudos *in vitro* demonstraram que os neutrófilos podem fagocitar as formas promastigotas, sofrer apoptose e serem fagocitados por macrófagos. Esse tipo de fagocitose não induz uma explosão respiratória, o que favorece a entrada e multiplicação do parasita nessas células (Souza et al., 2014; Zandbergen et al., 2004).

Os macrófagos são outro grupo de células que apresentam papel central na infecção. Atuam como células do hospedeiro tanto para a replicação do parasito, como células efetoras para matá-lo por intermédio das espécies reativas de oxigênio e nitrogênio. Uma vez infectadas, estas células produzem citocinas inflamatórias, como a Interleucina - 12 (IL - 12), que por sua vez, estimula a produção de interferon - gama (IFN - γ) pelas células Ta1 e células NK (Kedzierski e Evans, 2014; Peters et al., 2008). O IFN - γ liberado atua na ativação dos macrófagos pelo aumento da produção de óxido nítrico e peróxido de hidrogênio, favorecendo a atividade microbicida destas células (Pires, 2012; Schroder et al., 2004).

As células dendríticas, que também foram recrutadas ao sítio de infecção, apresentam capacidade fagocítica e de transporte dos antígenos de *Leishmania* aos linfonodos. O antígeno processado nas células dendríticas será apresentado às células Tvirgens que sofrerão diferenciação em células TCD4⁺ efetoras do tipo Ta1 ou Ta2. Caso as células Tvirgens se diferenciem para o tipo Ta1, ocorrerá produção de IFN - γ , que, portanto,

ativa os macrófagos para destruírem os parasitas intracelulares (Abbas, 2011; Silveira et al., 2009). Em contraste, na diferenciação para o tipo Ta2, ocorre produção de citocinas como IL - 4, IL - 5, IL - 10 e IL - 13, que atuarão como inativadoras dos macrófagos, contribuindo para a sobrevivência do parasito (Brombacher, 2000; Silveira et al., 2009).

Na LCL existe o desenvolvimento de uma resposta imune específica contra *Leishmania* caracterizada pela produção de citocinas do tipo Ta1, como IFN - γ , interleucina - 2 e fator de necrose tumoral - alfa (TNF - α) (Mendonça et al., 1986; Da-cruz et al., 1996). Além da resposta pró-inflamatória, a resposta Ta2 está presente com produção de IL - 4, IL - 5, IL - 10 e IL - 13, que podem inibir diversas funções dos macrófagos (Barral-Neto e Barral, 1994). Nesse tipo de leishmaniose, a lesão aparece após um período de latência que pode variar entre 1 a 3 meses, podendo durar por até 1 ano, e permanece restrita ao local da inoculação (Silveira et al., 2004). O desenvolvimento das lesões depende do estado imunológico do paciente. Elas podem evoluir para cura ou para destruição do tecido e formação de úlcera (Kaye e Scott, 2011; Coura, 2013).

Na LD estudos sugerem que a disseminação das lesões esteja relacionada a supressão inicial da resposta Ta1, com proliferação do parasito (Carvalho et al., 1994), uma vez que pacientes com LD têm uma produção de IFN - γ e TNF - α em níveis mais baixos quando comparados aos com LCL. Turetz et al. (2002) observaram que os pacientes com LD produziam mais IL - 5 e IL - 10, que os com LCL. A LD se caracteriza pela presença de lesões múltiplas, geralmente mais de 10, podendo chegar a centenas (Machado et al., 2011). A apresentação inicial é uma úlcera, e após alguns dias desenvolvem-se pápulas acneiformes que podem ou não sofrer necrose central (Couppiè et al., 2004). Para que o quadro seja caracterizado alguns autores consideram que devem ser observadas mais de 20 lesões. Esta forma de apresentação clínica está associada a infecção por *L. braziliensis*, *L. amazonensis*, *L. guyanensis* e *L. panamensis* (Vieira et al., 2002; Machado et al., 2011).

Nos casos de indivíduos com LCD, observam-se lesões nodulares disseminadas, sem ulceração, ricas em parasitos que podem estar distribuídas por todo o corpo. Testes realizados *in vitro* mostraram ausência de produção de IFN - γ por células mononucleares de sangue periférico e produção elevada de IL - 10 (Barral e Barral-Neto, 2009). No Brasil, esta forma de leishmaniose está associada a *L. amazonensis* (Pires et al., 2012).

A LCM é considerada uma das formas mais graves. Afeta as mucosas das vias aéreas superiores. A lesão inicial ocorre no nariz, no septo cartilaginoso, havendo disseminação para a cavidade nasal, palato, tonsilas, podendo chegar à laringe (Marsden, 1986). A resposta imune celular é caracterizada por aumento da produção de IFN - γ e TNF - α , associada a uma baixa resposta Ta2. Esses achados indicam que a resposta pró-inflamatória das citocinas é potencialmente lesiva para o tecido do hospedeiro (Da-Cruz et al., 2002).

Na LV, após a infecção com o parasito observa-se predomínio de linfócitos Ta2 e baixa produção de IL - 2 e IFN - γ . A apresentação clínica é espectral, variando entre assintomática até o quadro clássico da doença, que pode ser caracterizada pela presença de febre, hepatoesplenomegalia, anemia, comprometimento da medula óssea, dentre outros sintomas (Pastorino et al., 2002).

1.4. Aspectos gerais dos corpúsculos lipídicos e sua relação com *Leishmania* sp.

Os corpúsculos lipídicos são organelas ricas em lipídios presentes no citoplasma da maioria das células eucariontes. Apesar das variações em função, aparência e composição entre os diversos organismos e tipos celulares, todos são reconhecidos pela presença de um núcleo contendo lipídios neutros, principalmente triacilgliceróis e ésteres de esterol, cercados por uma monomembrana de fosfolipídios com proteínas associadas (Melo e Dvorak, 2012). Em eucariontes, a hipótese mais aceita a respeito da biogênese dessas organelas sugere que sejam sintetizadas por enzimas do

retículo endoplasmático (RE) e depositados entre as duas folhas da membrana deste. Depois, são liberadas no citoplasma carregando uma monomembrana proveniente da face citosólica da membrana do RE (Lima, 2011).

É sabido que os leucócitos de mamíferos em repouso apresentam poucos corpúsculos lipídicos, e que estes aumentam significativamente em células associadas a respostas inflamatórias, tais como, macrófagos, neutrófilos e eosinófilos e outros tipos celulares, e ainda sobre condições infecciosas (Bozza et al., 2009; Silva, 2012). Já foi demonstrado um aumento de corpúsculos lipídicos em células do hospedeiro e seu recrutamento para os vacúolos parasitóforos em infecções com diferentes tipos de parasitas, tais como, *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii*, *Mycobacterium leprae*, *Mycobacterium tuberculosis*, por exemplo (Araújo-Santos et al., 2014). Os mecanismos que desencadeiam a formação dos corpúsculos lipídicos que foram induzidos por micro-organismos intracelulares não são compreendidos (Lima, 2011).

Segundo Melo e Dvorak (2012), estudos patológicos evidenciam um aumento na formação de organelas lipídicas em macrófagos peritoneais de camundongos infectados com *L. amazonensis*. Rabhi et al. (2016) mostraram o recrutamento dos corpúsculos lipídicos para o vacúolo parasitóforo contendo o parasita *Leishmania*, estando ainda estes corpúsculos nas proximidades deste parasita. A localização dessas organelas lipídicas próxima ao vacúolo parasitóforo sugere que estas estão sendo utilizadas como fonte de nutrientes por esses agentes patogênicos (Araújo - Santos et al., 2014). Há evidências crescentes mostrando que os corpúsculos são importantes para a rápida produção de novos protozoários parasitas, uma vez que estes requerem grandes quantidades de lipídios para a biogênese das membranas de novas progênes (Toledo et al., 2016).

Nas células do sistema imune, os corpúsculos são reconhecidos como sítios para a geração de mediadores inflamatórios (eicosanoides: prostaglandinas e leucotrienos), uma vez que armazenam ácido araquidônico (AA) associado a fosfolipídios e lipídios neutros (Dvorak et al.,

1993). As enzimas envolvidas na conversão do AA em eicosanoides estão presentes dentro dos corpúsculos lipídicos das células ativadas no sistema imune, tais como macrófagos, eosinófilos e neutrófilos. Essas enzimas incluem as cicloxigenases (COX), as lipoxigenases (5-LO e 15-LO), as prostaglandinas E2 sintase (PGE2) e o leucotrieno C4 (LTC4) sintase (Melo et al., 2003; Bozza et al., 1997; Murphy, 2001). Os mediadores inflamatórios liberados têm a capacidade de modular a resposta imune. Os leucotrienos, por exemplo, atuam na quimiotaxia de leucócitos e na indução da produção de citocinas inflamatórias, como o TNF, e dessa forma pode inibir o crescimento de patógenos (Morato, 2013). Já as prostaglandinas podem favorecer este crescimento, ao inibirem a resposta ta1 , o TNF - α e/ou a produção de óxido nítrico no hospedeiro (Toledo et al., 2016).

1.5. Tratamento das leishmanioses

Durante décadas as drogas antimoniais e anfotericina B têm sido utilizadas para tratar as leishmanioses. Esses medicamentos são tóxicos, caros e frequentemente ineficazes, além disso, podem selecionar espécies mais resistentes causadoras dessa protozoose (Monzote, 2009).

No Brasil, o medicamento à base de antimônio, utilizado como primeira escolha na terapêutica da leishmaniose, é o antimoniato de metilglucamina. Este medicamento é utilizado para o tratamento da leishmaniose visceral, cutânea, difusa e mucosa. As eventuais falhas na terapia e o consequente aumento das formas resistentes de parasitas, podem estar relacionadas a utilização de baixas dosagens e a tratamentos descontínuos (Rath et al., 2003; Pelissari et al., 2011). A preconização dada pela Organização Mundial de Saúde é que se utilize doses de antimoniais que não ultrapasse 20 mg/kg/dia, devido à sua elevada toxicidade que pode causar vários efeitos colaterais, como, mialgias, dores abdominais, alterações hepáticas e distúrbios cardiológicos (Gontijo e Carvalho, 2003).

Além dos antimoniais, drogas como desoxicolato de anfotericina B e anfotericina B lipossomal também podem ser utilizadas (Pelissari et al.,

2011). A anfotericina B por ser mais potente pode ser utilizada como segunda opção para os pacientes que tenham contra-indicações ou tenham apresentado toxicidade ou refratariedade relacionadas ao uso dos antimoniais pentavalentes. Já a anfotericina B lipossomal, por ter alto custo, deve ser de uso restrito aos pacientes que tenham apresentado falha terapêutica ou toxicidade ao desoxicolato de anfotericina B (Brasil, 2010).

1.6. Malária

A malária é outra parasitose que também afeta uma proporção significativa da população humana global (Burrows et al., 2014). É causada por protozoários do gênero *Plasmodium*, sendo descritas cinco espécies desse gênero capazes de causar a malária em humanos: *P. falciparum*, *P. ovale*, *P. vivax*, *P. malariae* e o *P. knowlesi* (Beteck et al., 2014; Onguéné et al., 2013). O *Anopheles darlingi* tem sido considerado o principal mosquito vetor no Brasil. Cabe ressaltar que o mesmo está presente em cerca 80 % do território nacional (Oliveira - Ferreira et al., 2010).

Dados da Organização Mundial da Saúde (OMS) mostraram que houve cerca de 216 milhões de casos da malária no mundo em 2016, com 445 mil mortes. O Brasil apresentou neste mesmo ano, 77. 608 casos de malária autóctone. A maioria das mortes que acontecem em todo o mundo está relacionada a infecção por *P. falciparum* (WHO, 2017).

1.7. Ciclo biológico: *Plasmodium* sp.

A transmissão desse parasito ocorre quando a fêmea do anofelino, infectada, realiza o repasto sanguíneo, inocula esporozoítos na corrente sanguínea, e estas formas migram até os hepatócitos (Peiter et al., 2013). No interior do hepatócito, os esporozoítos passam por uma reprodução assexuada esquizônica e liberam milhares de merozoítos. Estes invadem os eritrócitos e dão início a outro ciclo esquizônico, conhecido como esquizogonia sanguínea, onde são liberados novos merozoítos infectantes e

gametócitos. Essas últimas formas ao serem sugadas pelo mosquito se reproduzem sexuadamente formando novos esporozoítos, fechando o ciclo biológico (Nogueira, 2010). Quando os merozoítos são liberados na corrente sanguínea (esquizogonia sanguínea), se observam manifestações clínicas como febre, mialgias e convulsões. A peridiocidade da esquizogonia sanguínea varia de acordo com a espécie, variando ente 36 a 48 h no caso do *P. falciparum* (Gomes et al., 2011).

1.8. Aspectos clínicos e imunológicos da malária

A gravidade da malária depende de fatores do hospedeiro (vulnerabilidade e estado imunológico) e também da espécie infectante envolvida na transmissão (Gomes et al., 2011).

De forma geral, os sintomas clássicos da doença são calafrios, seguidos de febre alta, que duram em média de 3 a 4 horas, acompanhados de mal - estar, náuseas, cefaleia, dores nas articulações. Passados um ou dois dias, esse quadro volta a se repetir por semanas até que o paciente, caso não tratado, se cure espontaneamente ou chegue a óbito devido as complicações renais, pulmonares ou cerebrais (Camargo, 2003).

A principal defesa do organismo contra os parasitos da malária é a fagocitose de merozoítos e hemácias parasitadas. Essa limpeza ocorre principalmente no baço, fígado e medula óssea, onde o sistema fagocítico mononuclear é abundante. Além disso, os linfócitos T ativam os linfócitos B aumentando a resposta humoral e ativam macrófagos ou células NK. A produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio produzidos por macrófagos ativados podem controlar a infecção por plasmódios (Veronesi e Focaccia, 1999).

Indivíduos que foram infectados com *P. falciparum*, com ausência de diagnóstico precoce e um tratamento adequado podem evoluir para a forma grave da doença ou malária grave (Lacerda-Queiroz et al., 2008). Sabe-se que a espécie *P. falciparum* é a mais virulenta e a única capaz de produzir alterações na microcirculação (Gomes et al., 2011). Na forma grave pode

ocorrer anemia, hipóxia, obstrução do fluxo cerebral, insuficiência renal aguda e colapso circulatório, porém vale ressaltar que o curso clínico da doença depende de fatores associados ao parasito e ao hospedeiro (Miller et al., 2002; Good, 2005). A produção de citocinas inflamatórias exerce função importante no controle da parasitemia no início da infecção. Em contrapartida, a produção excessiva dessas citocinas apresenta forte associação com a forma grave da doença, mostrando que as complicações na malária se relacionam a resposta imune do hospedeiro. O TNF - α , por exemplo, induz a expressão de moléculas de adesão endotelial, estas por sua vez, implicam no sequestro de células na microvasculatura cerebral, gerando uma obstrução do fluxo e hipóxia (Lacerda - Queiroz, 2008).

Trabalhos têm mostrado ainda que as hemácias infectadas por *P. falciparum* apresentam protusões eletrodensas em sua superfície, o que facilita a adesão dessas às células do endotélio de vênulas e capilares em diversas partes do corpo, como cérebro, pulmões, rins, por exemplo. Além disso, as células que estão infectadas são capazes de se ligar a células não infectadas, formando assim agregados celulares que podem comprometer a microcirculação (Dondorp et al., 2008).

1.9. Tratamento da malária

Os antimaláricos utilizados no Brasil incluem a cloroquina, primaquina, artemeter e lumefantrine. A prescrição do medicamento é feita de acordo com: o tipo de plasmódio identificado no indivíduo; a idade do paciente (ocorre maior toxicidade em crianças e idosos); a história de exposição anterior (indivíduos primoinfectados normalmente apresentam a forma mais grave da doença); e considerando condições como gravidez ou outras comorbidades (Ferreira et al., 2014; Ministério da Saúde, 2017).

A resistência à quimioterapia tem sido um problema de saúde pública que dificulta o controle da doença (Thipubon et al., 2015). A resistência intrínseca do *P. falciparum* às quinolinas antimaláricas, especialmente à

cloroquina tem sido bastante comum ao redor do mundo, principalmente na América do Sul e Sudeste Asiático (Sá, 2011).

Diante disso, em quase todos os países onde a malária é endêmica, a Organização Mundial de Saúde tem recomendado o uso de terapias combinadas com artemisinina (TCA) como primeira escolha para o tratamento da malária por *P. falciparum*, por exemplo (Sá, 2011).

1.10. Aspectos gerais da apoptose e sua relação com as infecções parasitárias

A apoptose é um tipo de morte celular caracterizada como limpa, silenciosa e programada pela própria célula (Mata, 2007), que acontece em situações fisiológicas normais tais como na deleção de células das criptas intestinais e na embriogênese, por exemplo. Além disso, pode ser desencadeada por agentes quimioterápicos, radiação, danos ao DNA, choque térmico, níveis aumentados de espécies reativas de oxigênio e por fatores infecciosos (Andrade, 2003; Anazetti e Melo, 2007; Grivicich et al, 2007). Quando uma célula entra em apoptose algumas características marcantes são observadas, incluindo seu encolhimento causando uma perda de aderência; perda da assimetria celular de modo que o fosfolípido fosfatidilserina (PS), que normalmente se localiza na face interna da membrana plasmática, passa a localizar-se na face externa da membrana; condensação da cromatina; desintegração do núcleo em fragmentos envoltos pela membrana nuclear e formação de prolongamentos na membrana da célula que aumentam e se rompem originando estruturas, contendo o conteúdo celular, conhecidas como corpos apoptóticos. Essas estruturas, que apresentam do lado externo da membrana a fosfatidilserina, são fagocitadas por macrófagos sem causar reação inflamatória (Grivicich et al, 2007; Mata, 2007; Horikawa e Peña, 2011). Quando os macrófagos reconhecem a PS sintetizam as citocinas anti-inflamatórias TGF - β (Fator de crescimento transformador beta) e IL - 10, e inibe-se a síntese da citocina inflamatória TNF - α (McDonald et al., 1999).

Alguns micro-organismos desenvolveram a capacidade de induzir a apoptose em células da imunidade inata e adaptativa, como uma estratégia para escapar das defesas do hospedeiro, uma vez que nesse processo uma resposta anti-inflamatória é gerada e os mecanismos microbicidas se tornam comprometidos. Patógenos como *Escherichia coli* e *Candida albicans* são conhecidos por induzir a apoptose em neutrófilos (Aga et al., 2002; Mata, 2007).

Por outro lado, a inibição da apoptose já foi descrita em infecções por *Toxoplasma gondii*, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania* sp., dentre outros (Gasques et al., 2013). Essa inibição pode favorecer o agente patogênico de forma a estender o seu período de vida nas células do hospedeiro (Aga et al., 2002). Em uma infecção por *L. major*, os neutrófilos são as primeiras células a migrarem para o sítio da infecção. Estas células internalizam a *Leishmania* e fornecem um ambiente favorável para sua replicação (Sunderkotter et al., 1993). Os neutrófilos possuem uma meia-vida curta permanecendo na circulação por cerca de 6 - 10h, após esse período passam pelo processo de apoptose. Acontece que, uma vez infectados, a *Leishmania* tem a capacidade de inibir a apoptose dessas células até a chegada dos macrófagos ao local da infecção, o que seria uma forma utilizada por ela para propagação, uma vez que os macrófagos fagocitam os corpos apoptóticos dos neutrófilos infectados (Laskay et al., 2003).

As características referentes à morte por apoptose distinguem-se da morte por necrose, esta definida como uma morte rápida e severa onde ocorre um aumento do volume da célula, agregação da cromatina, perda da integridade da membrana plasmática, extravasamento do meio intracelular gerando uma resposta inflamatória local e ainda danos as células vizinhas (Anazetti e Melo, 2007). Entre os agentes que podem induzir a necrose estão os vírus, as bactérias e os protozoários. Os patógenos que induzem necrose nas células das barreiras imunológicas (mucosa do intestino, por exemplo) diminuem a invasão de agentes patogênicos na superfície afetada pela inflamação, e no caso dos patógenos que são intracelulares, evitam o

suicídio apoptótico, e conseqüentemente diminuem a propagação desses agentes patogênicos (Proskuryakov et al., 2003).

A necrose ocorre também em situações fisiológicas normais, incluindo a renovação das células do intestino delgado e durante a maturação folicular da oogênese, lembrando que em ambas situações a apoptose também está envolvida (Mayhew et al., 1999; Murdoch et al., 1999).

1.11. Plantas medicinais

As plantas medicinais apresentam inúmeros constituintes benéficos ao homem que as tornam alvo de grande interesse no campo científico (Silva et al., 2007). Estudos químicos em vegetais revelam a presença de metabólitos secundários, tais como, terpenos, lignanas, taninos, alcaloides e quinonas, por exemplo. Muitos desses metabólitos depois de isolados são bases para a produção de medicamentos sintéticos (Bezerra, 2008).

Vale lembrar que o medicamento artemisinina usado para o tratamento da malária é proveniente da planta *Artemisia annua*, popularmente conhecida como Artemísia. A obtenção pelo processo tradicional tem dependido da plantação, colheita e confecção dos extratos, estando sujeitas à sazonalidade e flutuações do preço de mercado, o que prejudica o tratamento da doença, que apresenta alto índice de mortalidade em países pobres. Para tanto, a artemisinina semissintética está sendo produzida por processo industrial. O ácido artemisínico é produzido por meio de fermentação e sua transformação sintética por via fotoquímica. O novo sistema de síntese já aprovado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) vem sendo adotado. Essa produção tem mostrado um rendimento em cerca de um quinto do tempo que seria gasto pelo método convencional de origem apenas vegetal (Fapesp, 2013).

O Brasil representa uma das mais ricas biodiversidades do mundo com uma estimativa de cerca de 20 % do número total de espécies endêmicas presentes no planeta (Silva, 2013). Aproximadamente 40 % dos medicamentos disponíveis na terapêutica atual foram obtidos de fontes

naturais (Rodrigues e Nogueira, 2012). Foram desenvolvidos apenas 15 novos produtos para o tratamento de doenças como leishmaniose, malária e esquistossomose, entre 1975 e 1999, e 179 novos produtos para o tratamento das doenças cardiovasculares no mesmo período, sendo reconhecida pela Organização Mundial de Saúde a necessidade de desenvolvimento de novos fármacos para o combate dessas doenças menos assistidas que afetam principalmente os países em desenvolvimento (Medeiros, 2003).

A família Piperaceae é uma das famílias mais primitivas das angiospermas, com cerca de 10 a 12 gêneros e um número estimado de 1400 a 2000 espécies distribuídas nos trópicos. No Brasil, se encontram 5 gêneros, totalizando cerca de 460 espécies. Os maiores gêneros *Piper* e *Peperomia* são encontrados na flora brasileira (Parmar et al., 1997; Joly, 1998). Essa família possui relevante importância econômica, sendo empregada na produção de pimentas para o mercado mundial (Campos, 2006).

O gênero *Piper* abrange mais de 700 espécies distribuídas em regiões tropicais e subtropicais do mundo (Parmar et al., 1997). Algumas espécies são importantes para a medicina da China, Índia e América Latina, sendo usadas para o tratamento de numerosas doenças, tais como, dores no peito e reumatismo, apresentando ainda efeitos anestésico, analgésico e anti-inflamatório. Além das atividades descritas, numerosos estudos estão sendo realizados para avaliar o potencial antimicrobiano, antitumoral e antifúngico dessas espécies (Moraes et al., 2011), uma vez que se tem aumentado os micro - organismos patogênicos resistentes a múltiplas drogas disponíveis no mercado, levando a necessidade de se utilizar novas alternativas terapêuticas (Silva et al., 2007).

A espécie *Piper tuberculatum* Jacq. conhecida no nordeste do Brasil como “pimenta - longa” ou “pimenta - d’arda” tem sido amplamente utilizada para fins medicinais (Ferreira et al., 2010). A espécie *P. longum* L. foi descrita com atividade contra *Giardia lamblia* e *Entamoeba histolytica*. Chalconas extraídas de *P. aduncum* L. apresentaram atividade em cultivos

promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*. As espécies *P. sarmentosum* Roxb. e *P. hispidum* Sw. também apresentaram efeito antimalárico (Campos, 2006).

1.12. Amidas/cinamidas sintetizadas para este estudo tendo a piplartina como modelo

A piplartina é uma amida/alcaloide presente em espécies do gênero *Piper*, tais como *P. tuberculatum* Jacq. (pimenta - d' arda), *P. longum* L., *P. arborescens* Roxb. (pimenta do fruto ganchoso), *P. callosum* Ruiz & Pav. (João Brandim), *P. retrofractum* Vahl. e *P. sylvaticum* Roxb. (Parmar et al., 1997). Apresenta diferentes atividades farmacológicas. Mostrou ação leishmanicida quando testada *in vitro* em cultivos promastigotas de *L. donovani* e também quando testada *in vivo*, em *hamster* com leishmaniose visceral (Bodiwala et al., 2007), além de ter ação ansiolítica e antidepressiva, anti - inflamatória, antiplaquetária, antitumoral e atividade antifúngica (Bezerra, 2008). Considerando que a piplartina (Figura 1) apresenta diferentes atividades biológicas, como citado acima, foi usada como modelo para a síntese das amidas/cinamidas utilizadas nesse trabalho.

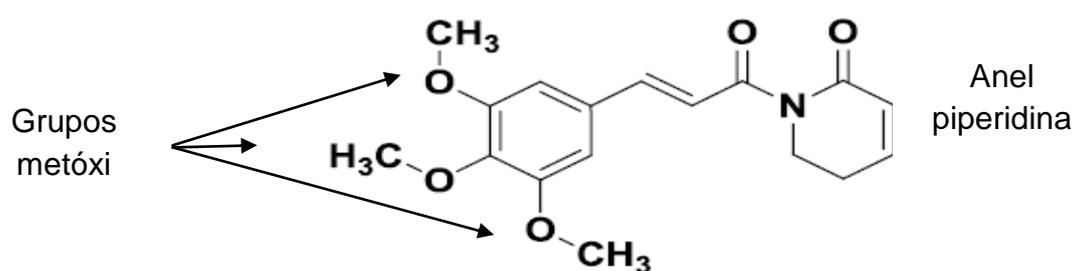


Figura 1. Estrutura química da piplartina, Fokoue (2015).

Sabe-se que a atividade biológica de um composto pode resultar das suas interações com o sistema biológico em estudo (Andrews, Craik et al., 1984). Estudar a relação estrutura - atividade desses compostos ajuda a entender essas interações. Uma ferramenta conhecida como modelagem

molecular assistida por computadores vem sendo amplamente utilizada para entender essas interações, uma vez que é possível por meio desta construir, editar, visualizar e analisar sistemas moleculares complexos (Sant' Anna, 2009).

As cinamidas sintetizadas para este estudo por Fokoue (2015), na Universidade de São Paulo, baseadas na estrutura química da piplartina, tiveram uma estrutura geral base (Figura 2).

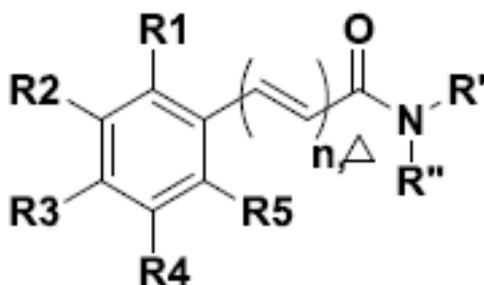


Figura 2. Estrutura geral dos análogos da piplartina, Fokoue (2015).

Foram sintetizados 4 análogos, dentre estes, os análogos (E)-1-morfolin-4-il-3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-en-1-ona e (E)-1-morfolin-4-il-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona diferiram da piplartina por uma inserção do elemento oxigênio no anel piperidina e por uma alteração do grupo metóxi no anel aromático. Já nos análogos (E)-3-(3,4-dimetoxifenil)-N-pentilprop-2-enamida e (E)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-N-pentilprop-2-enamida, houve alteração do grupo metóxi no anel aromático e uma substituição do anel piperidina por uma cadeia aberta denominada N-pentil (Fokoue, 2015).

Considerando que as leishmanioses e a malária respondem por uma alta carga de morbidade e mortalidade em todo mundo, tendo destaque para os países mais pobres e que o tratamento dessas doenças causa uma série de inconvenientes, tais como cardiotoxicidade, nefrotoxicidade e induz ainda a seleção de parasitos resistentes, a busca por compostos naturais que tenham ação antimalárica e leishmanicida tem crescido bastante nos últimos anos.

São descritos na literatura numerosos trabalhos que mostram a ação de substâncias extraídas de espécies do gênero *Piper* apresentando diferentes atividades biológicas. Estudos já realizados com a piplartina demonstraram redução das formas promastigotas de *L. donovani in vitro*, utilizando o ensaio MTT, e também quando testada *in vivo*, em *hamster* com leishmaniose visceral.

Esses achados nos impulsionaram a prosseguir com novos ensaios capazes de evidenciar o efeito da piplartina e das cinamidas sintéticas em *L. amazonensis*, pois esta atua como agente causadora da Leishmaniose Tegumentar Americana, que se caracteriza por apresentar uma ampla distribuição geográfica e também um rico espectro de manifestações de natureza clínica, histopatológica e imunológica. Além disso, ensaios serão realizados em cultivos celulares, especificamente macrófagos, por terem importante função no curso dessa infecção.

De forma semelhante, tendo em vista que a malária grave causa uma série de inconvenientes podendo levar o paciente a óbito, quando infectados por *P. falciparum*, faz-se necessário avaliar o efeito dessas amidas sobre este protozoário. O objetivo maior desse trabalho é encontrar novas substâncias que auxiliem no tratamento dessas doenças que acometem e matam milhares de pessoas no mundo.

Em vista disso, apesar de existirem vários trabalhos mostrando as diferentes atividades biológicas da piplartina, nosso trabalho se torna pioneiro por relacionar o efeito dessa amida e de seus derivados a modulação da resposta imune na leishmaniose, *in vitro*, pelos ensaios sobre os cultivos de *L. amazonensis*, sobre a toxicidade em células de mamíferos e, bem como, sobre as funções dessas células quando infectadas. Além disso, por avaliar o efeito dessas amidas sobre o *P. falciparum*.

2. OBJETIVOS

2.1. Primeiro objetivo geral

Avaliar o efeito da piplartina e de quatro cinamidas em cultivos dos protozoários, *P. falciparum* e *L. amazonensis*, e de células peritoneais de camundongos Swiss, visando a futuras aplicações biomédicas.

Objetivos específicos

- Determinar a concentração inibitória da piplartina e cinamidas nos cultivos dos protozoários;
- Determinar a dose tóxica nos cultivos das células peritoneais dos camundongos;
- Determinar o índice de seletividade dos compostos e selecionar as amidas com a melhor atividade leishmanicida e plamodicida.

2.2. Segundo objetivo geral

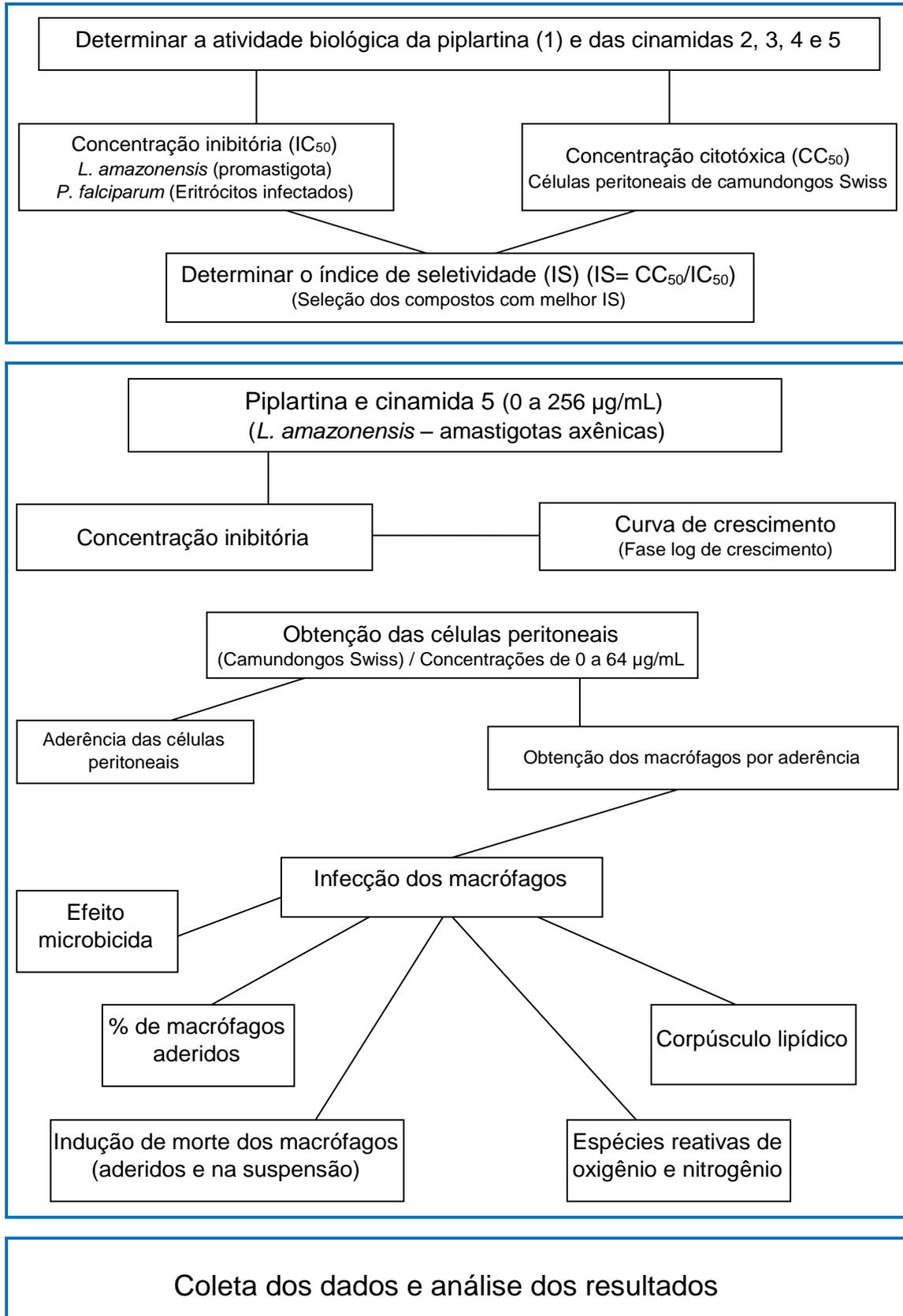
Avaliar o efeito microbicida da piplartina e da cinamida 5 em cultivos amastigotas de *L. amazonensis* e seu efeito na modulação da resposta imune inata de macrófagos peritoneais infectados.

Objetivos específicos

- Determinar a curva de crescimento e a concentração inibitória nas formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis*;
- Determinar o efeito microbicida em cultivos de macrófagos infectados e na aderência celular;
- Determinar o efeito na aderência das células peritoneais;
- Determinar o efeito na indução de morte celular dos macrófagos aderidos e na suspensão;
- Determinar o efeito na produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e na formação de corpúsculos lipídicos pelos macrófagos peritoneais aderidos;

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Delineamento experimental



3.2. Piplartina e cinamidas

A piplartina (1) foi obtida a partir da raiz da espécie *P. tuberculatum* Jacq (Piperaceae), coletada em 4 de maio de 2015 no jardim do Instituto de Química (Universidade de São Paulo). A identificação da espécie *P. tuberculatum* foi realizada pela Dra. Elsie F. Guimarães e a exsicata foi depositada no Herbário do Jardim Botânico do Rio de Janeiro, Brasil (Kato-0169). As raízes foram secas a 60 °C por 48 h e depois foram trituradas 105 g. O pó foi extraído quatro vezes com diclorometano:metanol (2:1; 400 mL). O extrato foi filtrado e concentrado em evaporador rotativo. O extrato bruto foi submetido à recristalização usando acetato de etila e metanol, produzindo a piplartina pura (150 mg) (Cotinguiba et al., 2009).

As cinamidas secundárias (2,3) e terciárias (4,5) foram sintetizadas adicionando trietilamina (3 equiv.) e amina (*N*-pentilamina e morfolina) para a solução de cloreto de ácido (1 equiv.) em CH₂Cl₂. A fim de preparar o cloreto de ácido, uma solução do ácido (*E*)-3,4,5-trimetoxicinâmico e do ácido (*E*)-3,4-dimetoxicinâmico (1 equiv.), foram preparadas pela condensação de Knoevenagel usando 3,4,5-trimetobenzaldeído, 3,4-dimetobenzaldeído e o ácido malônico, em tetrahidrofuram seco (10 mL), mantido sob atmosfera de nitrogênio, cloreto de oxalila (5 equiv.) adicionado gota a gota e agitando em temperatura ambiente por 5 - 6 h. O excesso de cloreto de oxalila foi então removido sob pressão reduzida produzindo o correspondente ao cloreto de ácido (Fokoue, 2015). A mistura da reação foi agitada durante a noite em temperatura ambiente e interrompida com NH₄Cl aquoso saturado, e extraiu-se com CH₂Cl₂ (três vezes). As fases orgânicas combinadas foram lavadas com salmoura e secas sobre MgSO₄. Após filtração e concentração, o resíduo foi purificado por cromatografia flash para fornecer as amidas desejadas (Adams et al., 2012).

(1)Piplartina:1-[(E)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-enoil]-2,3-idropiridin-6-ona (CAS: 20069-09-4 and PubChem CID: 637858): ¹H NMR (300 MHz; CDCl₃): δ 7.68 (*d*, 15.6 Hz, 1H, H-2), 7.43 (*d*, 15.6 Hz, 1H, H-3), 6.95 (*m*, 1H, H-2'), 6.81 (*s*, 2H, H-5, H-9), 6.04 (*dt*, 9.9 and 1.8 Hz, 1H, H-3'), 4.05 (*t*, 6.5, 2H, H-5'), 3.89 (*s*, 6H, OMe-6 and 8), 3.88 (*s*, 3H, OMe-7), 2.50 (*m*, 2H, H-4'). ¹³C NMR (75 MHz, CDCl₃): δ 168.70 (C-1), 165.76 (C-1'), 153.30 (C-6, C-8), 145.50 (C-3'), 143.70 (C-4), 139.90 (C-7), 130.60 (C-3), 125.70 (C-2'), 121.00 (C-2), 105.40 (C-5, C-9), 60.89 (OMe-7), 56.11 (OMe-6 and 8), 41.62 (C-5'), 24.70 (C-4'). EI-MS (*m/z*) (%): 317 (90, M⁺), 274 (32), 221 (100), 190 (32). ESI-MS: [M+H]⁺ (*m/z*) calculated: 318.1336; found 318.1337.

(2)E-1-morfolin-4-il-3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-en-1-ona (CAS: 1215221-17-2 and PubChem CID: 6438283): ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.62 (*d*, 15.4 Hz, 1H, H-3), 6.74 (*s*, 2H, H5, H-9), 6.72 (*d*, 15.4 Hz, 1H, H-2), 3.90 (*s*, 6H, OMe-6 and 8), 3.88 (*s*, 3H, OMe-7), 3.73 (*s*, 8H, H-1', H-2', H-4', H-5'). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 165.47 (C-1), 153.36 (C-6, C-8), 143.26 (C-3), 139.67 (C-7), 130.61 (C-4), 115.67 (C-2), 105.00 (C-5, C-9), 66,80 (C-2', C-4'), 60.89 (OMe-7), 56.15 (OMe-6 and 8), 45,56 (C-1'), 42,36 (C-5'). EI-MS (*m/z*) (%): 307 (50, M⁺), 222 (60), 221 (100), 190 (25). ESI-MS: [M+H]⁺ (*m/z*) calculated: 308.1492, found: 308.1496.

(3)E-1-morfolin-4-il-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona(CAS: 1703-34-06 and PubChem CID: 438283): ¹H NMR (200 MHz, CDCl₃): δ 7.66 (*d*, 15.4 Hz, 1H, H-3), 7.14 (*dd*, 8.4 and 2.0 Hz, 1H, H-8), 7.04 (*d*, 2.0 Hz, 1H, H-5), 6.87 (*d*, 8.4 Hz, 1H, H-9), 6.71 (*d*, 15.4 Hz, 1H, H-2), 3.93 (*s*, 3H, OMe-6), 3.92 (*s*, 3H, OMe-7), 3.73 (*s*, 8H, H-1', H-2', H-4', H-5'). ¹³C NMR (50 MHz, CDCl₃): δ 165.77 (C-1), 150.63 (C-6), 149.10 (C-7), 143.20 (C-3), 128.07 (C-4), 121.86 (C-9), 114.16 (C-2), 111.07 (C-8), 109.86 (C-5), 66.83 (C-2', C-4'), 55.91 (OMe-6 and 7), 45.61 (C-1'), 42.69 (C-5'). EI-MS (*m/z*) (%): 277 (31.M⁺), 192 (23), 191 (100). ESI-MS: [M+H]⁺ (*m/z*) calculated: 278.1387, found: 278.1389.

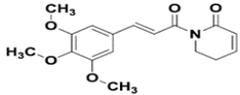
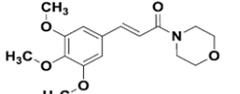
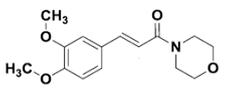
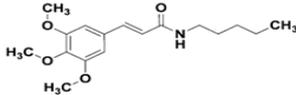
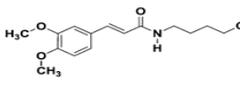
(4)(E)-3-(3,4-dimetoxifenil)-N-pentilprop-2-enamida(CAS: 574007-48-0 and 19173974): ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 7.54 (*d*, 15.6 Hz, 1H, H-3), 6.73 (*s*, 2H, H5, H-9), 6.32 (*d*, 15.6 Hz, 1H, H-2), 3.88 (*s*, 6H, OMe-6 and 8), 3.87 (*s*, 3H, OMe-7), 3.39 (*t*, 6.7 Hz, 2H, H-1'), 1.58 (*m*, 2H, H-2'), 1.35 (*m*, 4H, H3', H-4'), 0.91 (*t*, 7.4 Hz, 3H, H-5'). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): 165.72 (C-1), 153.36 (C-6, C-8), 140.73 (C-3), 139.50 (C-7), 130.45 (C-4), 120.15 (C-2), 104.88 (C-5, C-9), 60.91 (OMe-7), 56.10 (OMe-6 and 8), 39.75 (C-1'), 29.35 (C-2'), 29.08 (C-3'), 22.35 (C-4'), 13.95 (C-5'). EI-MS (*m/z*) (%): 307 (85, M^+), 236 (45), 222 (100), 221 (95), 190 (30), 181 (55). ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ (*m/z*) calculated: 308.1856, found: 308.1859.

(5)(E)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-N-pentilprop-2-enamida (CAS: 467247-64-9 and PubChem CID: 5856629): ^1H NMR (200 MHz, CDCl_3): δ 7.56 (*d*, 15.5 Hz, 1H, H-3), 7.11-7.06 (*dd*, 8.4 and 1.8 Hz, 1H, H-9), 7.02 (*d*, 1.8 Hz, 1H, H-5), 6.85 (*d*, 8.4 Hz, 1H, H-8), 6.26 (*d*, 15.5 Hz, 1H, H-2), 3.91 (*s*, 6H, OMe-6 and 7), 3.38 (*m*, 2H, H-1'), 1.61-1.54 (*m*, 2H, H-2'), 1.38-1.32 (*m*, 4H, H-3', H-4'), 0.91 (*t*, 7.2 Hz; 3H, H-5'). ^{13}C NMR (50 MHz, CDCl_3): δ 166.03 (C-1), 150.51 (C-6), 149.11 (C-7), 140.66 (C-3), 127.87 (C-4), 121.85 (C-9), 118.68 (C-2); 111.08 (C-8), 109.66 (C-5), 55.94 (OMe-6), 55.86 (OMe-7), 39.73 (C-1'), 29.41 (C-2'), 29.10 (C-3'), 22.37 (C-4'), 13.98 (C-5'). EI-MS (*m/z*) (%): 277 (43, M^+), 206 (35), 192 (40), 191 (100), 151 (45). ESI-MS: $[\text{M}+\text{H}]^+$ (*m/z*) calculated: 278.1751, found: 278.1758.

A piplartina (**1**) e as cinamidas **2**, **3**, **4**, e **5** foram diluídas em dimetilsulfóxido (DMSO) a 1% e a partir dessa pré - diluição foi realizada a diluição seriada para início dos ensaios.

A tabela 1 mostra a estrutura química da piplartina (**1**) e das cinamidas **2**, **3**, **4** e **5**.

Tabela 1. Estrutura química da piplartina (1) e das cinamidas 2, 3, 4 e 5.

Amidas		Estrutura química	Massa Molar (g/mol)
1	Piplartina: 1-[(E)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-enil]-2,3-diidropiridin-6-ona		317,34
2	(E)-1-morfolin-4-il-3-(3,4-dimetoxifenil)prop-2-en-1-ona		307,34
3	(E)-1-morfolin-4-il-3-(3,4,5-trimetoxifenil)prop-2-en-1-ona		277,32
4	(E)-3-(3,4-dimetoxifenil)-N-pentilprop-2-enamida		307,38
5	(E)-3-(3,4,5-trimetoxifenil)-N-pentilprop-2-enamida		277,36

3.3. Micro-organismos

A. *L. amazonensis*

A cepa MHOM/BR/pH8 proveniente do Laboratório de Leishmaniose do Núcleo de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, mantida em criopreservação, foi transferida para o meio de cultura sólido NNN (Novy-MacNeal-Nicolle) por 48 h a 24 °C. Em seguida, as formas promastigotas foram transferidas e cultivadas em meio RPMI 1640, suplementado com 10 % de soro fetal bovino inativado (Sigma-Aldrich) e gentamicina (40 mg/mL) (Schering Plough) até que os parasitos atingissem a fase Log de crescimento.

B. *P. falciparum*

A cepa Pf/Unb169 proveniente do Laboratório de Malária da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, mantida em criopreservação, foi descongelada e cultivada em eritrócitos humanos O⁺ em meio RPMI 1640 (Sigma - Aldrich, St. Louis, USA), suplementado com 0,25 mg/dL de hipoxantina, 10 % de soro humano e gentamicina (40 mg/mL) (Schering Plough, São Paulo, Brasil) a 37 °C em ar com 5 % de CO₂. Para os ensaios foi preparada uma suspensão contendo um hematócrito de 3 % e 0,6 % eritrócitos infectados.

3.4. Animais

Para a obtenção das células peritoneais foram utilizados camundongos da linhagem Swiss (machos e fêmeas), não isogênicos, pesando de 30 a 40g, provenientes do biotério da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília. Durante os experimentos os animais foram mantidos no alojamento de animais na Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília sob temperatura ambiente ciclo claro/escuro de 12 h, alimentados com ração balanceada e recebendo água potável *ad libitum*. O projeto de pesquisa foi aprovado pelo Comitê de ética no Uso Animal (CEUA) do instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília. Doc nº 126599/2013.

3.5. Determinação *in vitro* da dose tóxica da pipartina (1) e das cinamidas (2 - 5) sobre *P. falciparum*

Para avaliar o efeito tóxico da pipartina e das cinamidas sobre o parasito, foram iniciados cultivos em placas de 96 escavações (Lab Tech, Melbourn, Inglaterra). Uma suspensão de eritrócitos humanos O⁺ (0,6 % de parasitemia e 3 % de hematócrito) foi incubada a 37°C na presença de 5 % de CO₂, por 48 ou 72 h, em meio RPMI 1640 suplementado com 10 % do

soro humano, em triplicata, com diferentes concentrações (0 a 256 µg/mL /100 µL) das amidas **1** a **5**. Para o controle positivo, artesunato de sódio (Artemix Ativus, São Paulo, Brasil) na concentração de 8 ng/mL, e para o controle negativo, meio RPMI 1640. Os cultivos de 72 h foram submetidos à troca de meio após 48 h de incubação, retirando-se 150 µL do sobrenadante de todos os poços, depois acrescentando 100 µL contendo as diferentes concentrações das amidas com 50 µL de RPMI completo. Decorrido 48 e 72 h de incubação, o sobrenadante foi desprezado, o sedimento restante foi homogeneizado, distendido (uma gota) sobre lâminas para microscopia, secas, fixadas com metanol absoluto e, coradas com solução Giemsa a 10 % em STF pH 6,9, por 15 min. Foram examinadas em microscopia óptica para determinação do percentual de eritrócitos infectados, observados 1000 eritrócitos em cada preparação, com aumento de 100x, por um único observador (Muniz - Junqueira e Tosta, 2009, com adaptações).

3.6. Determinação do efeito da piplartina (1) e das cinamidas (2 - 5) em cultivos promastigotas de *L. amazonensis* pelo método MTT

O ensaio de citotoxicidade realizado com o sal MTT é essencial nas fases iniciais de testes com novas drogas. Esse sal (amarelado) entra nas mitocôndrias de células metabolicamente ativas e é clivado pela enzima succinato desidrogenase, produzindo cristais de formazan, cuja coloração é azul escura. A quantidade de cristais de formazan formada é diretamente proporcional ao número de células viáveis e quanto maior a formação de cristais de formazan maior é o resultado da absorbância (Bragança et al., 2012).

Para determinar o efeito da piplartina e derivados em cultivos promastigotas de *L. amazonensis*, 10⁶ promastigotas/escavação/100 µL foram incubados em placa de 96 escavações, em triplicata, em meio RPMI 1640 acrescido com 10 % de soro fetal bovino, na presença de diferentes concentrações das amidas **1** - **5** (0 a 256 µg/mL/100 µL) por 2 h a 24 °C. Em seguida, 10 µL da solução contendo 5 mg/mL de MTT [3-(4,5-

dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma-Aldrich) foi adicionada às escavações e os cultivos foram novamente incubados nas mesmas condições por 4 h, ao abrigo da luz. Para a solubilização dos cristais de formazam foi adicionada a cada escavação 50 µL de DMSO. Para o controle positivo foi utilizado 4 µg/mL de antimoniato de N - metilglucamina e para o controle negativo meio RPMI 1640 suplementado com 10 % de soro fetal bovino inativado. A leitura das absorbâncias foi feita a 570 nm em espectrofotômetro (Spectra Max[®] Plus 384, Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Os resultados foram expressos em percentual (Kuckelhaus, 2011).

3.7. Obtenção e quantificação das células peritoneais dos camundongos Swiss

Os camundongos foram previamente anestesiados em câmara de dióxido de carbono (CO₂). Depois disso, através de uma incisão central no abdômen, as células peritoneais foram coletadas por meio da injeção de 10 mL de salina tamponada fosfato (STF) resfriada, pH 7,2, centrifugadas a 4°C, a 400xG por 10 min. O sobrenadante foi descartado e o sedimento ressuspenso em 1 mL de RPMI 1640 (Sigma-Aldrich, St Louis, EUA) incompleto (RPMI estoque + bicarbonato de sódio a 7,5 %). Em seguida, as células foram quantificadas em hemocítômetro com 0,05 % de solução de nigrosina (corante do tipo aniônico que não penetra em células vivas, Emilson e cols, 1978). As suspensões de células foram mantidas sob refrigeração em tubos plásticos graduados de 15 mL (Labtech, Melbourn, Inglaterra) até o início dos experimentos.

3.8. Determinação da dose tóxica da piplartina (1) e cinamidas (2 - 5) em células peritoneais de camundongos pelo método MTT

Para avaliar o efeito tóxico da piplartina (1) e cinamidas (2 - 5), foi realizado o método do MTT em cultivos de células peritoneais (coleta descrita conforme item 3.7). Uma suspensão contendo 2×10^5

células/escavação foi distribuída, em triplicata, em placa de 96 escavações na presença de diferentes concentrações das amidas **1 - 5** (0 a 256 µg/mL) incubadas em câmara úmida a 37°C, na presença de 5 % de CO₂ em ar por 2 h. Decorrido esse tempo, 10 µL de um solução de MTT (5 mg/mL) foi adicionada às escavações e depois re-incubadas nas mesmas condições descritas por 4 h, em seguida, foi acrescido às escavações 50 µL de DMSO para a solubilização dos cristais de formazam. A leitura das absorbâncias foi em espectrofotômetro (Spectra Max[®] Plus 384) a 550 nm. Os resultados foram expressos em percentual.

3.9. Determinação da dose tóxica da piplartina (1) e da cinamida 5 em células peritoneais de camundongos pela coloração com nigrosina

Para avaliar a dose tóxica de **1** e **5**, foram utilizadas placas de 24 escavações com lamínulas de 13 mm previamente depositadas para aderência das células. Uma suspensão com 2×10^5 células/300µL foi distribuída por escavação, em seguida adicionadas as diferentes concentrações de **1** e **5** (0 a 256 µg/mL/100 µL), em triplicatas. Nas escavações para o controle negativo, foi adicionado somente a suspensão de células (400 µL) em meio RPMI 1640 incompleto. Em seguida, a placa foi incubada por 4 h a 37°C com 5 % CO₂. Após o período de incubação, as lamínulas foram retiradas com auxílio de uma pinça, e imediatamente, uma gota de nigrosina foi colocada sobre a mesma e levada a uma lâmina para posterior leitura em microscopia óptica com aumento de 40x. Foi estimado o total de células vivas e mortas em 5 % da área da lamínula, correspondendo a 10 campos microscópicos (área da lamínula: 38,46mm; área da objetiva: 175,7µm²) (Kuckelhaus, 2009, com adaptações).

3.10. Índice de Seletividade

Os índices de seletividade (IS) das amidas **1** a **5** foram obtidos calculando-se a razão entre as concentrações capazes de inibir a viabilidade

de 50 % das células peritoneais (CC₅₀) para cada composto pelas concentrações capazes de inibir o crescimento de 50 % das formas promastigotas/amastigotas de *L. amazonensis* ou das formas intraeritrocitárias de *P. falciparum*. Compostos que apresentarem o IS maior que 10 são considerados seguros para as células do hospedeiro (Bézivin et al., 2003).

3.11. Curva de crescimento para cultivos amastigotas axênicas de *L. amazonensis*

Cultivos promastigotas de *L. amazonensis* (MHOM/BR/ph8), foram mantidos em meio RPMI 1640 (Sigma - Aldrich, St. Louis, USA), suplementado com 10 % de soro fetal bovino inativado (Sigma - Aldrich, St. Louis, USA) e gentamicina (40 mg/mL) (Schering Plough, São Paulo, Brasil), a 24°C até a fase Log de crescimento. Depois disso, foram transferidos à estufa a 37°C para completar o ciclo de vida, isso dura em média sete dias. Foi realizada contagem do 1° ao 8° dia para avaliar o crescimento do parasito no formato amastigota.

3.12. Determinação do efeito da piplartina (1) e da cinamida 5 em cultivos amastigotas axênicas de *L. amazonensis* pelo método MTT

Para determinar o efeito da piplartina (1) e da cinamida 5 em cultivos amastigotas de *L. amazonensis* foram utilizadas concentrações das amidas variando entre 0 a 256 µg/mL/100 µL, e uma suspensão contendo 10⁶ leishmânias/100 µL. Os cultivos foram incubados por 2 h, em estufa à 37°C. Decorrido o tempo de incubação, foi acrescentado, ao abrigo da luz, 10 µL da solução de MTT (5 mg/mL) [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (Sigma-Aldrich), e retomada a incubação por mais 4 h à 37°C. Finalizada a incubação, foi adicionado em cada escavação 50 µL de DMSO. Para o controle negativo foi utilizado meio RPMI 1640 nas mesmas condições. Os ensaios foram realizados em triplicata em placas de

microcultivo de 96 escavações. A leitura foi realizada em espectrofotômetro a 570 nm (Spectra Max[®] Plus 384, Molecular Devices, Sunnyvale, USA). Os resultados foram expressos em percentual.

3.13. Determinação do efeito da piplartina (1) e da cinamida 5 em cultivos amastigotas axênicas de *L. amazonensis* pela coloração com nigrosina

O ensaio de viabilidade celular utilizando nigrosina permite determinar o percentual de células vivas ou mortas, através da microscopia óptica. Por esse método é possível avaliar a integridade funcional da membrana plasmática, pois a nigrosina é capaz de penetrar nas células mortas, onde a permeabilidade da membrana se encontra alterada, sendo possível corar o DNA. Logo, as células mortas ficam com uma coloração escura e as vivas ficam sem coloração (Emilson et al., 1978; Souza et al., 2015b).

Para avaliar o efeito da piplartina (1) e da cinamida 5 em cultivos amastigotas de *L. amazonensis* foram utilizadas concentrações das amidas variando entre 0 a 256 µg/mL/100 µL, e uma suspensão contendo 10⁶ leishmânias/100 µL. Os cultivos foram incubados por 4 h, em estufa à 37°C. Após incubação, foi retirada uma alíquota de 50 µL da suspensão e homogeneizada com 50 µL de nigrosina para avaliação de ocorrência ou não de leishmânias vivas ou mortas. As células foram quantificadas em hemocitômetro na objetiva de 40x. O experimento foi realizado em triplicata em placa de 96 escavações. Os resultados foram expressos em percentual (Kuckelhaus, 2009, com adaptações).

3.14. Avaliação do efeito microbicida e de aderência da piplartina (1) e da cinamida 5 em macrófagos infectados ou não com formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis*

Para avaliar o efeito microbicida da piplartina (1) e da cinamida 5 em macrófagos infectados ou não com *L. amazonensis*, foram utilizadas placas de 24 escavações com lamínulas de 13 mm previamente depositadas no fundo dessas escavações. Foi preparada uma suspensão em meio RPMI incompleto com $2 \times 10^5/500$ μL células. A suspensão foi incubada por 2 h a 37°C com 5 % CO_2 para aderência dos macrófagos. Decorrido esse tempo, as escavações foram lavadas três vezes com STF a 37°C (pH 7,2) para remoção das células não aderidas. Então, foi adicionado em cada escavação 10^6 formas amastigotas de *L. amazonensis*/500 μL em meio RPMI completo (RPMI estoque + bicarbonato de sódio a 7,5 % + 10 % de soro fetal bovino inativado) e incubadas por 12 h a 37°C com 5 % CO_2 . Após esse período, foram realizadas três lavagens com STF a 37°C para remoção das leishmânias não fagocitadas e depois incubadas novamente por 4 h com diferentes concentrações de 1 e 5 (0,25; 1; 4; 16 e 64 $\mu\text{g/mL}$). Passado esse tempo, foram lavadas duas vezes com STF a 37°C, uma vez com RPMI completo (com soro fetal a 20 %), secas, fixadas com metanol, secas, coradas com giemsa a 10 % por 10 min, lavadas com água, secas e montadas em lâminas de microscopia. Para o índice de infecção foram considerados 200 macrófagos e visualizados em microscopia óptica (100x) por um único observador. Para calcular o % de macrófagos infectados foi utilizada a seguinte fórmula: (% Macrófagos com leishmânias x 100/Total de células consideradas. Para a média de leishmânias por macrófagos: (Total de leishmânias/macrófagos infectados). Para o índice de infecção: % Macrófagos infectados x média de leishmânias por macrófagos.

Para determinar o percentual estimado de células aderidas sobre as lamínulas foram quantificadas, em microscopia óptica (40x) o total de células presentes em 10 % da área da lamínula, correspondendo a 20 campos microscópicos (área da lamínula: 38,46 mm; área da objetiva: 175,7 μm^2).

3.15. Avaliação do efeito da piplartina (1) e da cinamida 5 na aderência das células peritoneais dos camundongos

Para avaliar o efeito de aderência das células peritoneais coletadas, foram utilizadas placas de 24 escavações com lamínulas de 13 mm previamente depositadas no fundo dessas escavações. Foi preparada uma suspensão em meio RPMI 1640 incompleto com $2 \times 10^5/500 \mu\text{L}$ células, em seguida adicionadas as diferentes concentrações de **1** e **5** (0 a $64 \mu\text{g/mL}/100 \mu\text{L}$). A suspensão células/amidas foi incubada por 2 h a 37°C com 5 % CO_2 . Após incubação, as escavações foram lavadas duas vezes com STF a 37°C , secas com ar quente, fixadas com metanol, secas, coradas com giemsa a 10 %, lavadas com água e montadas em lâminas de microscopia para avaliação em microscopia óptica (40x) por um único observador. Foi estimado o total de células aderidas em 10 % da área da lamínula, correspondendo a 20 campos microscópicos (área da lamínula: $38,46 \text{ mm}^2$; área da objetiva: $175,7 \mu\text{m}^2$). Os resultados foram expressos em percentual (Kuckelhaus, 2009, com adaptações).

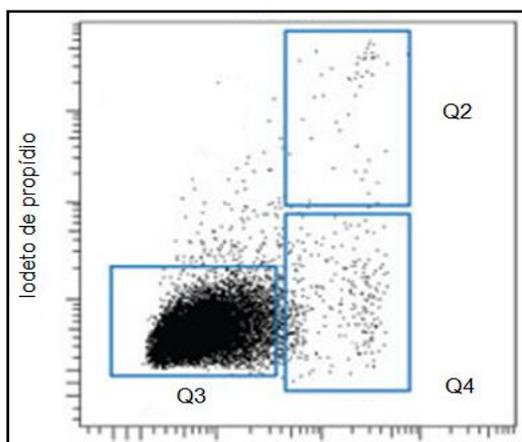
3.16. Efeito da piplartina e da cinamida 5 sobre a indução de morte celular em macrófagos peritoneais infectados ou não por *Leishmania* – Marcação e análise das células com Anexina e Iodeto de Propídio

Para avaliar o tipo de morte celular ocorrida nos macrófagos peritoneais infectados ou não com *L. amazonensis* foi realizado o ensaio com o kit de apoptose Anexina V – FITC (Life Science Source, Bio Vision, USA), por citometria de fluxo (BD LSRFortessa™). A Anexina V é uma proteína que detecta células apoptóticas devido a sua ligação ao fosfolípido fosfatidilserina. A fosfatidilserina é predominantemente observada na superfície interna da bicamada lipídica, que está voltada para o citosol. No início da apoptose, a membrana celular permanece intacta mas sofre uma desorganização, fazendo com que este fosfolípido seja translocado para a superfície exterior da bicamada. A anexina V conjugada ao FITC

(Isotiocianato de fluoresceína) identifica e quantifica as células que estão em apoptose. O marcador nuclear fluorescente Iodeto de propídio (PI) é utilizado para identificar e quantificar células que estão em apoptose tardia/necrose. O PI é uma molécula que se intercala no DNA, devido a membrana celular estar permeável. Este marcador, não penetra em células intactas. Assim, as células foram marcadas simultaneamente com Anexina V - FITC e com o corante PI a fim de diferenciar células que estão em apoptose inicial das que estão em apoptose tardia/necrose (Valente, 2011).

Foi preparada uma suspensão em meio RPMI incompleto com $2 \times 10^5/100 \mu\text{L}$ células, incubadas por 2 h a 37°C com 5 % de CO_2 , em placa de microcultivo de 96 escavações para a aderência dos macrófagos. Depois disso, foi adicionado 10^6 formas amastigotas de *L. amazonensis*/ $100 \mu\text{L}$ em meio RPMI completo em cada escavação e incubadas por 12 h a 37°C com 5% CO_2 . Após a incubação, as escavações foram lavadas três vezes com STF a 37°C (pH 7,2) para remoção das leishmânias não fagocitadas e então, as células foram novamente incubadas, a 37°C com 5 % CO_2 , por 4 h com as diferentes concentrações da piplartina (1) e da cinamida 5 (0,25; 1; 4; 16 e 64 $\mu\text{g}/\text{mL}/200 \mu\text{L}$). Como controles: Controle basal - somente macrófagos; Controle leishmânia - macrófagos e leishmânia; Controle diluente - macrófagos e DMSO (0,5 %) e Controle positivo - macrófagos e peróxido de hidrogênio a 30 % (0,5 mM). Após 4 h, foi coletado o sobrenadante de todas as escavações e levados a eppendorfs devidamente identificados (Sobrenadante - Piplartina; Sobrenadante - Cinamida 5). Para soltar as células aderidas nessas escavações, foi colocado 200 μL de albumina de soro bovino (BSA) gelada a 2 %, homogeneizadas e transferidas a outros eppendorfs devidamente identificados (Células aderidas – Piplartina; Células aderidas – Cinamida 5). Todos os eppendorfs foram centrifugados a 1500 rpm/10 min, descartados os sobrenadantes e ressuspensos com 200 μL da solução binding, sendo mantidos em isopor próximo ao gelo. Nos microtubos do sobrenadante foi adicionado 0,2 μL de anexina e 0,2 μL de iodeto de propídio. Nos microtubos das células aderidas, 1 μL de anexina e 1 μL de iodeto de propídio. Foram incubados por 10 min, ao abrigo da luz e

depois lidos no citômetro de fluxo. Ensaio realizado em triplicata. Resultados expressos em percentual. A figura 3 mostra como os resultados são dispostos após análise por citometria de fluxo. As análises foram realizadas pelo software FACSDIVA.



Anexina V - FITC

Figura 3. Células marcadas com Iodeto de propídio e Anexina V – FITC. Mostrando: Q2 (Apoptose tardia/necrose – An⁺PI⁺), Q3 (Célula viva – An⁻PI⁻) e Q4 (Apoptose inicial – An⁺PI⁻). Fonte: Cellsignal.com, adaptado.

3.17. Quantificação de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) em cultivos de macrófagos peritoneais de camundongos infectados ou não por *Leishmania* e tratados com diferentes concentrações da piplartina (1) e da cinamida 5

Para a quantificação de H₂O₂ nos cultivos de macrófagos infectados e tratados com a piplartina (1) e a cinamida 5 foi utilizado o marcador de pH 3, 3', 5, 5'- tetramethylbenzidine (TMB) e a peroxidase tipo II. A peroxidase tipo II atua na decomposição do H₂O₂, e diante dessa reação ocorre mudança de pH do meio. O TMB tem a função de marcar essa variação de pH. Quanto maior a produção de H₂O₂ maior a variação de pH (Rhee et al., 2010).

Foi preparada uma suspensão em meio RPMI incompleto com 2x10⁵/200 µL células, incubadas por 2 h a 37°C com 5 % de CO₂, em placa de microcultivo de 96 escavações para aderência dos macrófagos. Após a incubação, as escavações foram lavadas três vezes com STF (pH 7,2) para remover as células não aderidas e então, adicionado em cada escavação 10⁶ formas amastigotas de *L. amazonensis*/200 µL em meio RPMI completo

e incubadas por 12 h a 37°C com 5 % CO₂. Depois disso, as escavações foram lavadas três vezes com STF a 37°C (pH 7,2) para remoção das leishmânias não fagocitadas e, então novamente incubadas por 24 h com as diferentes concentrações da piplartina (1) e da cinamida 5 (0,25; 1; 4; 16 e 64 µg/mL). Para o controle negativo foi utilizado somente macrófagos e RPMI completo. Para o controle positivo Acetato de Forbol Miristato (PMA) a 40 mM. Durante a incubação foi preparada uma curva padrão em peróxido de hidrogênio (0 µM; 0,39 µM; 0,78 µM; 1,56 µM; 3,12 µM; 6,25 µM; 12,5 µM; 25 µM; 50 µM e 100µM) e uma solução 'A' com 20 µL de peroxidase tipo II (2,5 mU), 150 µL de 3, 3', 5, 5'- tetramethylbenzidine (TMB - 0,7 mM) e 9830 µL de STF pH=6,0 (0,1M). Após 24 h de incubação com as amidas, 10 µL das diluições da curva padrão, 10 µL do sobrenadante dos cultivos tratados com as amidas foram levadas a outra placa acrescidas de 200 µL da solução 'A', homogeneizada e deixada em temperatura ambiente por 15 min. A reação foi interrompida com H₂SO₄ a 0,5 M e as leituras das absorbâncias foram feitas em espectrofotômetro a 450 nm (SpectraMax® Plus384). Os resultados foram expressos em micromoles (µM) de H₂O₂.

3.18. Quantificação de óxido nítrico em cultivos de macrófagos peritoneais de camundongos infectados ou não por *Leishmania* e tratados com diferentes concentrações da piplartina (1) e da cinamida 5

O óxido nítrico é um radical livre produzido durante a conversão enzimática da L-arginina para a L-citrulina por membros da família de proteínas óxido nítrico sintase (NOS) que se decompõe de forma rápida em nitrito e nitrato. A produção de óxido nítrico por macrófagos peritoneais de camundongos foi avaliada utilizando o reagente de Greiss pela quantificação de nitrito desses cultivos, segundo a técnica descrita por Green et al., (1982).

Foi preparada uma suspensão em meio RPMI incompleto com 2x10⁵/200µL células, incubadas por 2 h a 37°C com 5 % de CO₂, em placa de microcultivo de 96 escavações para a aderência dos macrófagos. Após a

incubação, as escavações foram lavadas três vezes com STF a 37°C (pH 7,2) para remover as células não aderidas e então, adicionado em cada escavação 10^6 formas amastigotas de *L. amazonensis*/200 µL em meio RPMI completo e incubadas por 12 h a 37°C com 5 % CO₂. Depois disso, as escavações foram lavadas três vezes com STF a 37°C (pH 7,2) para remoção das leishmânias não fagocitadas e, então novamente incubadas por 24 h com as diferentes concentrações da piplartina (1) e da cinamida 5 (0,25; 1; 4; 16 e 64 µg/mL). Para o controle negativo foi utilizado somente macrófagos e RPMI completo. Para o controle positivo lipopolissacarídeo (LPS *Escherichia coli*, sorotipo 055:b5, Sigma-Aldrich, St Louis, EUA, a 50 ng/mL), preparadas em meio RPMI 1640 completo 200 µL/escavação. Terminada a incubação, as placas foram submetidas à centrifugação a 400xG por 10 min e em seguida, transferido 100 µL do sobrenadante de cada escavação para outra placa com 100 µL do reagente de Greiss. A curva padrão foi preparada com diferentes concentrações (0 µM; 0,39 µM; 0,78 µM; 1,56 µM; 3,12 µM; 6,25 µM; 12,5 µM; 25 µM; 50 µM e 100 µM) de nitrito de sódio (NaNO₂), em água destilada. As leituras das reações colorimétricas foram feitas em espectrofotômetro a 540 nm e os resultados expressos em milimoles (mM) de nitrito (Kuckelhaus, 2009b, com adaptações).

3.19. Efeito da piplartina (1) e da cinamida 5 sobre a formação de corpúsculos lipídicos por macrófagos infectados ou não por *Leishmania* - Marcação citoquímica com óleo vermelho (Oil-Red)

Para quantificação dos corpúsculos lipídicos foi utilizada a coloração com óleo vermelho (oil red). Esse corante apresenta grande solubilidade para substâncias lipofílicas, que se apresentam na cor vermelha no citoplasma dos macrófagos (Oil Red O Staining Protocol, 2012).

Para avaliar o efeito da piplartina (1) e da cinamida 5 em macrófagos infectados com *L. amazonensis* na produção de corpúsculos lipídicos, foram utilizadas placas de 24 escavações com lamínulas de 13 mm previamente

depositadas no fundo dessas escavações. Foi preparada uma suspensão em meio RPMI incompleto com 2×10^5 /500 μ L células, incubada por 2 h a 37°C com 5 % CO₂ para a aderência dos macrófagos. Decorrido esse tempo, as escavações foram lavadas três vezes com STF pH 7,2, a 37°C, para remoção das células não aderidas, e então adicionado 10^6 formas amastigotas de *L. amazonensis*/500 μ L em meio RPMI completo em cada escavação e incubadas por 12 h a 37°C com 5 % CO₂. Após a incubação, as escavações foram lavadas três vezes com STF a 37°C para a remoção das leishmânias não fagocitadas e então, as células foram novamente e incubadas, a 37°C com 5 % CO₂, por 4 h com as diferentes concentrações da piplartina (1) e da cinamida 5 (0,25; 1; 4; 16 e 64 μ g/mL). Para o controle negativo foi utilizado somente macrófagos e RPMI completo. Já o controle positivo foi utilizado LPS a 1 μ g/mL. As escavações foram lavadas duas vezes com STF pH 7,2, a 37°C e depois fixadas com paraformaldeído 4 % por 30 min, lavadas duas vezes com STF pH 7,2 e uma vez com álcool isopropílico a 60 %, coradas com Oil Red® por 15 min, lavadas uma vez com álcool isopropílico a 60 %, duas vezes com água milique, coradas com hematoxilina por 5 min, lavadas uma vez com água destilada e uma vez com milique e montadas em meio gelatinoso, seladas com esmalte transparente. Foram quantificadas (200 células/lamínula) em microscopia óptica na objetiva de 100x. Para calcular o % de macrófagos com corpúsculos lipídicos foi utilizada a seguinte fórmula: (% Macrófagos com corpúsculos x 100/Total de células consideradas. Para a média de corpúsculos por macrófagos: (Total de corpúsculos/macrófagos com corpúsculos). Para o índice de infecção: % Macrófagos com corpúsculos x média de corpúsculos por macrófagos.

3.20. Análise estatística

A normalidade das variáveis foi analisada empregando-se o teste de Kolmogorov-Smirnov e a homogeneidade das variâncias, empregando-se o teste de Bartlett. Teste t pareado ou Wilcoxon foram usados para comparar

duas amostras normais ou não normais, respectivamente. As análises e as representações gráficas foram feitas empregando-se o programa Prism® Software Package (GraphPad, USA, 1997) e diferenças de $p < 0,05$ foram consideradas significantes

4. RESULTADOS

4.1. Determinação *in vitro* da dose tóxica da pipartina (1) e das cinamidas 2 - 5 sobre *P. falciparum*

Os resultados obtidos em cultivos de eritrócitos infectados com *P. falciparum* mostraram que a incubação com a pipartina (1) por 48 ou 72 h foi capaz de inibir o crescimento de 100 % dos parasitos com 64 ou 8 µg/mL, respectivamente, na comparação com o controle (Teste t pareado; $p < 0,05$). A pipartina (1) e as demais amidas (2 - 5) inibiram o crescimento de *P. falciparum* num padrão dose dependente, onde a inibição de 100 % dos parasitos foi alcançada com 8 µg/mL para a pipartina em 72 h. O artesunato foi capaz de inibir 79,8 % ou 90,0 % dos parasitos em 48 ou 72 h de incubação. As concentrações capazes de inibir o crescimento de 50 % dos parasitos foram estimadas conforme demonstrado na tabela 2.

Tabela 2. Percentual de eritrócitos infectados por *P. falciparum* depois de 48 ou 72 horas de incubação com diferentes concentrações da piplartina (1) e das cinamidas 2, 3, 4 e 5.

Tempo (horas)	Amidas	Concentrações das substâncias ($\mu\text{g/mL}$) e o percentual de eritrócitos infectados (Média \pm DP)										IC ₅₀ $\mu\text{g/mL}$
		0	1	2	4	8	16	32	64	128	256	
48	1	99 \pm 2,1	69 \pm 11,3*	67 \pm 2,5*	67 \pm 8,4*	20 \pm 14*	10 \pm 5,5*	5 \pm 1*	0 \pm 0*	0 \pm 0*	0 \pm 0*	6,2
	2	99 \pm 2,1	83 \pm 8,3*	80 \pm 8,4*	84 \pm 14,6*	65 \pm 0*	69 \pm 6,3*	72 \pm 6,3*	69 \pm 6,3*	36 \pm 11,4*	10,3 \pm 0*	100
	3	99 \pm 2,1	78 \pm 3,2*	78 \pm 6,3*	82 \pm 5,5*	65 \pm 5,5*	78 \pm 6,3*	76 \pm 11*	76 \pm 10*	18 \pm 3,2*	0 \pm 0*	92,9
	4	99 \pm 2,1	76 \pm 5,5*	72 \pm 8,3*	67 \pm 6,3*	63 \pm 3,2*	58 \pm 6,3*	41 \pm 3,2*	18 \pm 8,4*	8 \pm 3*	0 \pm 0*	24,3
	5	99 \pm 2,1	89 \pm 11,4*	65 \pm 11*	72 \pm 8,3*	76 \pm 0*	63 \pm 6,3*	45 \pm 8,3*	36 \pm 3,1*	16 \pm 5,4*	0 \pm 0*	28,2
72	1	99 \pm 0,1	71 \pm 0,8*	65 \pm 0,8*	40 \pm 0,7*	0 \pm 0*	0 \pm 0*	0 \pm *	0 \pm 0*	0 \pm 0*	0 \pm 0*	3,2
	2	99 \pm 0,1	80 \pm 18*	80 \pm 9*	79 \pm 9*	78 \pm 12,3*	76 \pm 6*	58 \pm 12*	21 \pm 9*	5 \pm 0*	0 \pm 0*	39,0
	3	99 \pm 0,1	96 \pm 3,4*	90 \pm 17*	96 \pm 3,4*	92 \pm 13,6*	85 \pm 3*	84 \pm 9*	76 \pm 20,4*	66 \pm 20,4*	39 \pm 3*	173,0
	4	99 \pm 0,1	86 \pm 12,2*	90 \pm 12*	76 \pm 6*	76 \pm 0*	64 \pm 0*	64 \pm 10,2*	15 \pm 12,2*	7 \pm 3,4*	0 \pm 0*	41,4
	5	99 \pm 0,1	72 \pm 14*	66 \pm 7*	58 \pm 18*	49 \pm 12,3*	17 \pm 6*	13 \pm 7*	6 \pm 0,6*	0 \pm 0*	0 \pm 0*	6,6

IC₅₀: Concentração inibitória. (*) valores considerados significativos quando comparados com o controle (Teste t pareado; p<0,05).

4.2. Determinação do efeito da piplartina (1) e cinamidas 2 - 5 em cultivos promastigotas de *L. amazonensis* pelo método MTT

Nossos resultados mostraram que a incubação por 6 h com a piplartina (1) ou cinamidas 2 - 5 inibiram o crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis* num padrão dose dependente sem, contudo, inibir o crescimento da totalidade dos parasitos até a máxima concentração testada (256 µg/mL), na comparação com o controle (Teste t pareado; $p < 0,05$). O antimoniato de N-metilglucamina foi capaz de inibir 55,4 % dos parasitos depois de 6 h de incubação. Os percentuais de parasitos viáveis bem como as concentrações inibitórias capazes de inibir 50 % (IC_{50}) deles são mostrados na tabela 3.

Tabela 3. Percentual de formas promastigotas viáveis de *L. amazonensis* depois de 6 h de incubação com diferentes concentrações das amidas

Amidas	Concentrações das substâncias ($\mu\text{g/mL}$) e o percentual de viabilidade por MTT (Média \pm DP)										IC₅₀ $\mu\text{g/mL}$
	0	1	2	4	8	16	32	64	128	256	
1	99 \pm 0,1	81 \pm 16,7*	87 \pm 7,6*	75 \pm 5,6*	66 \pm 12,3*	63 \pm 3,0*	58 \pm 5,3*	55 \pm 9,9*	54 \pm 5,8*	43 \pm 2,5*	179
2	99 \pm 0,1	94 \pm 2,3*	88 \pm 4,1*	97 \pm 3,6*	96 \pm 6,5*	86 \pm 5,9*	88 \pm 0,5*	88 \pm 1,7*	77 \pm 3,0*	60 \pm 3,2*	338
3	99 \pm 0,1	97 \pm 1,8*	94 \pm 4,7*	92 \pm 2,0*	95 \pm 1,3*	89 \pm 4,7*	93 \pm 4,2*	87 \pm 3,6*	91 \pm 9,6*	79 \pm 3,9	594
4	99 \pm 0,1	103 \pm 16,2*	101 \pm 6,9*	94 \pm 9,0*	105 \pm 16,0*	94 \pm 15,9*	92 \pm 6,8*	92 \pm 12,9*	90 \pm 10,5*	73 \pm 5,1*	434
5	99 \pm 0,1	84 \pm 6,6*	80 \pm 9,4*	77 \pm 7,6*	77 \pm 5,6*	74 \pm 3,7*	68 \pm 6,3*	61 \pm 3,4*	44 \pm 5,5*	29 \pm 3,5*	106

IC₅₀: Concentração inibitória; (*) valores considerados significativos quando comparados com o controle (Teste t pareado; p=0,05).

4.3. Determinação da dose tóxica da piplartina (1) e cinamidas 2 - 5 em células peritoneais de camundongos pelo método MTT e determinação da dose tóxica da piplartina (1) e da cinamida 5 em células peritoneais de camundongos pela coloração com nigrosina

O ensaio com MTT para avaliar os possíveis efeitos citotóxicos das amidas **1** a **5** em cultivos de células peritoneais mostrou que a incubação por 6 h com as diferentes concentrações das substâncias foi capaz de diminuir a viabilidade celular num padrão dose dependente na comparação com o controle (Teste t pareado; $p < 0,05$). Os resultados mostraram também que a média \pm DP das concentrações capazes de diminuir a viabilidade de 50 % das células (CC_{50}) foi de $294,4 \pm 85,7$ com mínimo de 232,0 (**1**) e máximo de 445,0 $\mu\text{g/mL}$ (**4**) (Tabela 4).

Com relação ao ensaio realizado, utilizando a coloração com nigrosina, para avaliar os possíveis efeitos citotóxicos das amidas **1** e **5** sobre as células peritoneais, a incubação por 4 h com as diferentes concentrações foi capaz de diminuir a viabilidade celular na comparação com o controle (Teste t pareado; $p < 0,05$). Os resultados mostraram ainda que as concentrações capazes de diminuir a viabilidade de 50 % das células (CC_{50}) foram de 94,0 para **1** e 151 $\mu\text{g/mL}$ para **5** (Tabela 5).

Tabela 4. Percentual de células peritoneais viáveis depois de 6 h de incubação com diferentes concentrações das amidas.

Amidas	Concentrações das substâncias ($\mu\text{g/mL}$) e o percentual de viabilidade por MTT (Média \pm DP)										CC₅₀ $\mu\text{g/mL}$
	0	1	2	4	8	16	32	64	128	256	
1	99 \pm 0,9	77 \pm 6,9*	69 \pm 0,4*	71 \pm 1,0*	69 \pm 5,2*	72 \pm 7,7*	65 \pm 4,0*	61 \pm 1,2*	55 \pm 4,7*	48 \pm 3,2*	232
2	99 \pm 0,9	73 \pm 4,6*	71 \pm 2,2*	75 \pm 8,1*	74 \pm 0,7*	70 \pm 0,1*	71 \pm 7,0*	70 \pm 3,3*	64 \pm 2,2*	54 \pm 5,8*	267
3	99 \pm 0,9	74 \pm 3,3*	73 \pm 0,7*	71 \pm 2,7*	70 \pm 1,6*	72 \pm 2,5*	67 \pm 1,8*	70 \pm 1,6*	62 \pm 3,4*	53 \pm 1,3*	274
4	99 \pm 0,9	72 \pm 6,9*	71 \pm 1,4*	77 \pm 1,2*	70 \pm 2,4*	63 \pm 7,5*	68 \pm 2,0*	69 \pm 5,1*	65 \pm 6,8*	61 \pm 4,0*	445
5	99 \pm 0,9	73 \pm 6,0*	69 \pm 0,0*	69 \pm 1,0*	69 \pm 4,5*	64 \pm 6,0*	61 \pm 6,0*	61 \pm 2,0*	62 \pm 3,0*	48 \pm 1,7*	254

Tabela 5. Percentual de células peritoneais viáveis depois de 4 h de incubação com diferentes concentrações das amidas.

Amidas	Concentrações das substâncias ($\mu\text{g/mL}$) e o percentual de viabilidade por nigrosina (Média \pm DP)										CC₅₀ $\mu\text{g/mL}$
	0	1	2	4	8	16	32	64	128	256	
1	99 \pm 0,7	83 \pm 3,0*	89 \pm 2,2*	95 \pm 2,6	98 \pm 4,4	86 \pm 2,9*	77 \pm 1,9*	54 \pm 2,2*	46 \pm 10,5*	43 \pm 6,2*	94
5	99 \pm 0,7	92 \pm 3,4*	94 \pm 2,0*	89 \pm 5,7	97 \pm 1,5	95 \pm 0,1	97 \pm 1,2	92 \pm 1,5*	56 \pm 9,3*	29 \pm 11,7*	151

CC₅₀: Concentração citotóxica; (*) valores considerados significativos quando comparados com o controle (Teste t pareado; p<0,05).

4.4. Índice de seletividade

Os índices de seletividade determinados pela razão entre CC_{50} e IC_{50} mostraram que para as formas promastigotas de *L. amazonensis* as amidas 1, 2, 3, 4 e 5 apresentaram índices inferiores a 10. Nos cultivos de *P. falciparum* por 48 h os índices de seletividade foram superiores a 10 para os compostos 1 (37,4) e 4 (18,3), enquanto que nos cultivos de 72 h os índices de seletividade foram superiores a 10 para os compostos 1 (72,5), 4 (10,7) e 5 (38,4) (Tabela 6).

Tabela 6. Índice de seletividade dos compostos 1, 2, 3, 4, e 5 para as formas promastigotas de *L. amazonensis* e para as formas intraeritrocitárias de *P. falciparum* (48 ou 72 horas de incubação).

Amidas	Índice de Seletividade (CC_{50}/IC_{50})		
	<i>L. amazonensis</i> (promastigotas)	<i>P. falciparum</i> (48 h)	<i>P. falciparum</i> (72 h)
1	1,3	37,4	72,5
2	0,7	2,6	6,8
3	0,4	2,9	1,5
4	1,0	18,3	10,7
5	2,4	9,0	38,4

4.5. Curva de crescimento para cultivos amastigotas axênicas de *L. amazonensis*

A contagem das amastigotas em cultura (10 mL) foi realizada do 1° ao 8° dia. Foi observado crescimento do parasito até o 6° dia de cultivo. A figura 4 mostra as fases lag, log ou exponencial, estacionária e de declínio. Para infecção dos macrófagos, foram utilizados os cultivos que estavam no final da fase log de crescimento.

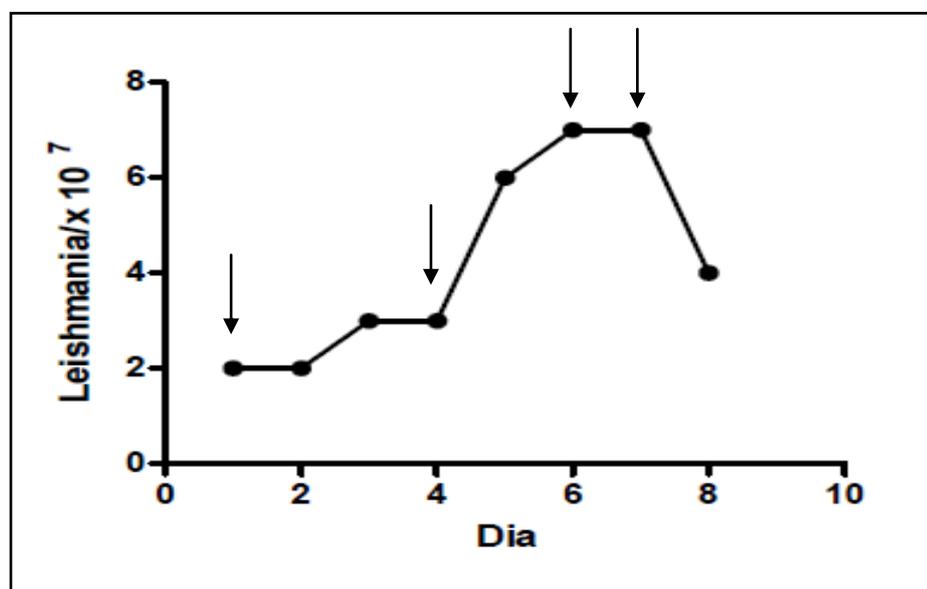


Figura 4. Curva de crescimento de cultivos amastigotas de *L. amazonensis* a 37°C. As setas indicam o início das fases lag (1º dia), log ou exponencial (4º dia), estacionária inicial (6º dia) e de declínio (7º dia).

4.6. Determinação do efeito da piplartina (1) e da cinamida 5 em cultivos amastigotas axênicas de *L. amazonensis* pelo método MTT e pela coloração com nigrosina

Nossos resultados mostraram que a incubação por 6 h com a piplartina (1) e a cinamida 5 inibiu o crescimento das formas amastigotas de *L. amazonensis* em todas concentrações quando avaliadas pelo método MTT. Da mesma forma, no ensaio que foi feito pela coloração com nigrosina, observou-se nos cultivos uma diminuição da viabilidade após 4 h de incubação com as amidas 1 e 5 em todas as concentrações testadas. O percentual de viabilidade e as concentrações inibitórias (IC₅₀) são mostrados nas tabelas 7 e 8.

Tabela 7. Percentual de viabilidade das formas amastigotas de *L. amazonensis* depois da incubação com diferentes concentrações das amidas 1 e 5.

<i>Amidas</i>	<i>Concentrações das substâncias (µg/mL) e o percentual de viabilidade por MTT (Média ± DP)</i>										<i>IC₅₀</i> <i>µg/mL</i>
	0	1	2	4	8	16	32	64	128	256	
1	99±0,1	92±0,0	73±5,2*	77±1,2*	80±4,3*	80±6,6*	80±2,8*	76±8,4*	69±1,7*	59±2,2*	333
5	99±0,1	84±3,3	81±12,3	74±3,0*	80±4,0	82±12,0	80±3,9	79±7,3	74±3,0*	72±5,4*	612

Tabela 8. Percentual de viabilidade das formas amastigotas de *L. amazonensis* depois da incubação com diferentes concentrações das amidas 1 e 5.

<i>Amidas</i>	<i>Concentrações das substâncias (µg/mL) e o percentual de viabilidade por nigrosina (Média ± DP)</i>										<i>IC₅₀</i> <i>µg/mL</i>
	0	1	2	4	8	16	32	64	128	256	
1	99±1,5	99±0,4	99±1,1	99±1,0	98±1,0*	90±2,0*	79±0,5*	75±4,5*	58±10,4*	46±5,2*	210
5	99±1,5	99±0,4	99±1,1	99±0,5	94±1,5	88±1,5*	85±1,1*	78±1,5*	79±5,5*	82±2,6*	711

IC₅₀: Concentração inibitória; (*) valores considerados significativos quando comparados com o controle. (Teste t pareado; p<0,05).

4.7. Avaliação do efeito microbicida da piplartina (1) e da cinamida 5 em macrófagos infectados ou não com formas amastigotas axênicas de *L. amazonensis*

Quando avaliado o efeito da piplartina (1) no percentual de macrófagos infectados, foi observada uma diminuição da infecção em relação ao controle não tratado ($91,7 \pm 3,2$) para as concentrações 1 $\mu\text{g/mL}$ ($83,17 \pm 9,5$), 16 $\mu\text{g/mL}$ ($74,4 \pm 15,5$) e 64 $\mu\text{g/mL}$ ($80,2 \pm 10,2$) (Teste t pareado, $p < 0,05$). Para as demais concentrações, 0,25 $\mu\text{g/mL}$ ($90,5 \pm 2,7$) e 4 $\mu\text{g/mL}$ ($90,0 \pm 3,9$) não houve diferenças (Teste t pareado, $p > 0,05$) (Figura 5A).

Com relação à média de leishmânias fagocitadas pelos macrófagos, os resultados indicam que houve uma diminuição apenas para a concentração de 64 $\mu\text{g/mL}$ ($3,2 \pm 0,4$) em relação ao controle ($5,0 \pm 1,2$) (Teste t pareado $p < 0,05$). Nas demais concentrações avaliadas, 0,25 $\mu\text{g/mL}$ ($4,5 \pm 0,7$), 1 $\mu\text{g/mL}$ ($5,0 \pm 0,8$), 4 $\mu\text{g/mL}$ ($4,2 \pm 0,5$) e 16 $\mu\text{g/mL}$ ($3,8 \pm 1,4$) não houve diminuição da média de leishmânias ingeridas por macrófagos (Teste t pareado, $p > 0,05$) (Figura 5B).

Semelhantemente, para o índice de infecção, os resultados mostraram que houve uma diminuição desse índice para a maior concentração 64 $\mu\text{g/mL}$ ($260 \pm 39,7$) (teste t pareado $p < 0,05$) comparada ao controle não tratado ($442,3 \pm 113$). Para as demais concentrações, 0,25 $\mu\text{g/mL}$ ($415,2 \pm 69,8$), 1 $\mu\text{g/mL}$ ($407,5 \pm 57,3$), 4 $\mu\text{g/mL}$ ($385,1 \pm 53,1$) e 16 $\mu\text{g/mL}$ ($303,9 \pm 154,7$) não houve diminuição em comparação ao controle não tratado (teste t pareado $p > 0,05$) (Figura 5C). Especificamente, a piplartina reduziu a infecção 41,3 % com 64 $\mu\text{g/mL}$.

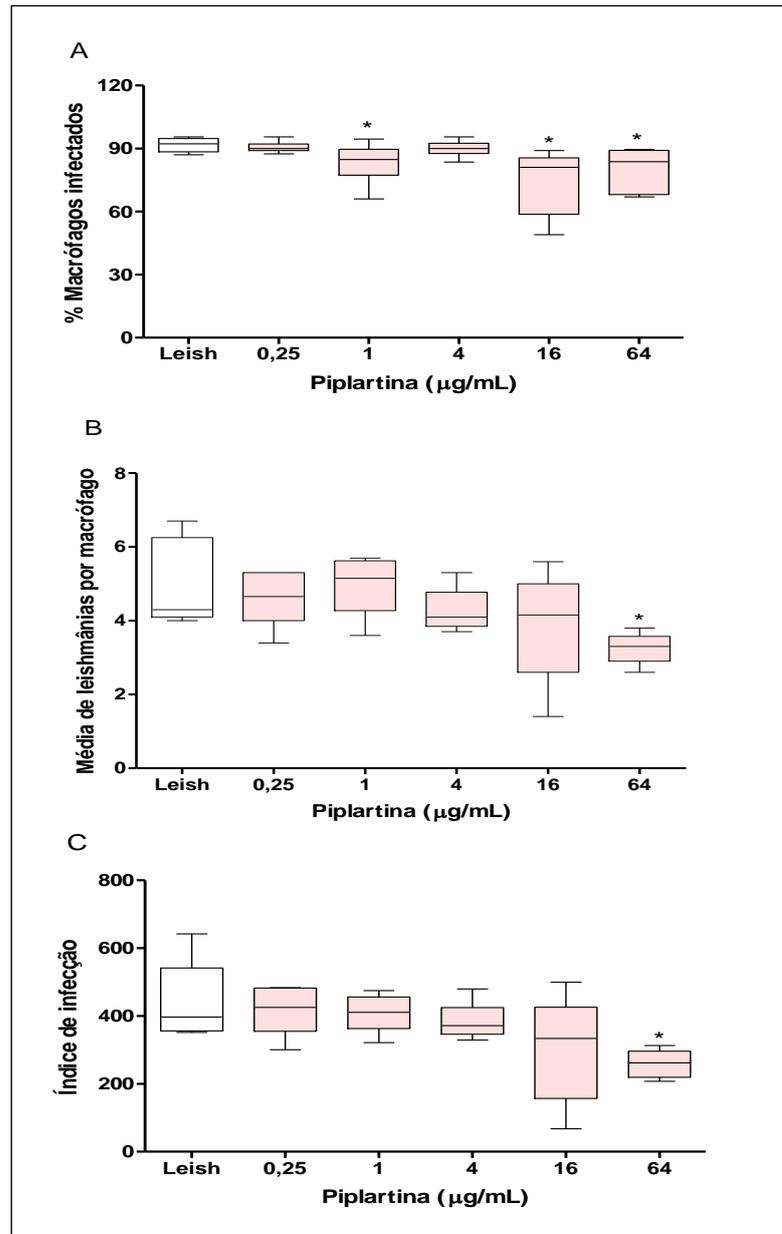


Figura 5. Efeito da piplartina em cultivos de macrófagos peritoneais de camundongos swiss (n=6) infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis*. Em A percentual de macrófagos infectados, em B, média de leishmânias ingeridas por macrófagos e em C, índice de infecção. Os resultados foram avaliados pelo Teste t pareado. (*) valores considerados significativos quando comparados ao controle ($p < 0,05$). Os dados estão representados em medianas, quartis valores máximos e mínimos.

Para os cultivos tratados com a cinamida **5**, quando avaliado o percentual de macrófagos infectados, foi observada uma diminuição da infecção em relação ao controle ($92,2 \pm 2,8$) para a concentração de 64 $\mu\text{g/mL}$ ($85,6 \pm 2,0$) (Teste t pareado, $p < 0,05$). Para as demais, 0,25 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$ e 4 $\mu\text{g/mL}$ não houve diferenças ($p > 0,05$) (Figura 6A)

Com relação à média de leishmânias fagocitadas por macrófagos, os resultados indicam que houve uma diminuição apenas para a concentração 64 $\mu\text{g/mL}$ ($3,6 \pm 0,4$) em relação ao controle ($5,3 \pm 1,0$). Nas demais concentrações avaliadas, 0,25 $\mu\text{g/mL}$, 1 $\mu\text{g/mL}$, 4 $\mu\text{g/mL}$ e 16 $\mu\text{g/mL}$ não houve diferenças ($p > 0,05$) (Figura 6B).

Semelhantemente, para o índice de infecção, os resultados mostraram que houve uma diminuição do índice de infecção na maior concentração 64 $\mu\text{g/mL}$ ($315,1 \pm 44,1$) e um aumento da infecção a 4 $\mu\text{g/mL}$ ($525,3 \pm 98,3$) comparada ao controle não tratado ($470,4 \pm 87,7$) (Teste t pareado $p < 0,05$). Nas demais concentrações avaliadas, 0,25 $\mu\text{g/mL}$ ($459 \pm 41,6$), 1 $\mu\text{g/mL}$ ($438,1 \pm 63,9$), 16 $\mu\text{g/mL}$ ($454,9 \pm 33,6$) não houve diferenças ($p > 0,05$). Especificamente, a cinamida **5** reduziu a infecção em 33,1 % com 64 $\mu\text{g/mL}$ e aumentou a infecção em 12 % com 4 $\mu\text{g/mL}$ (Figura 6C). A figura 7 mostra a fotomicrografia de macrófagos peritoneais infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com diferentes concentrações de **1** e **5**.

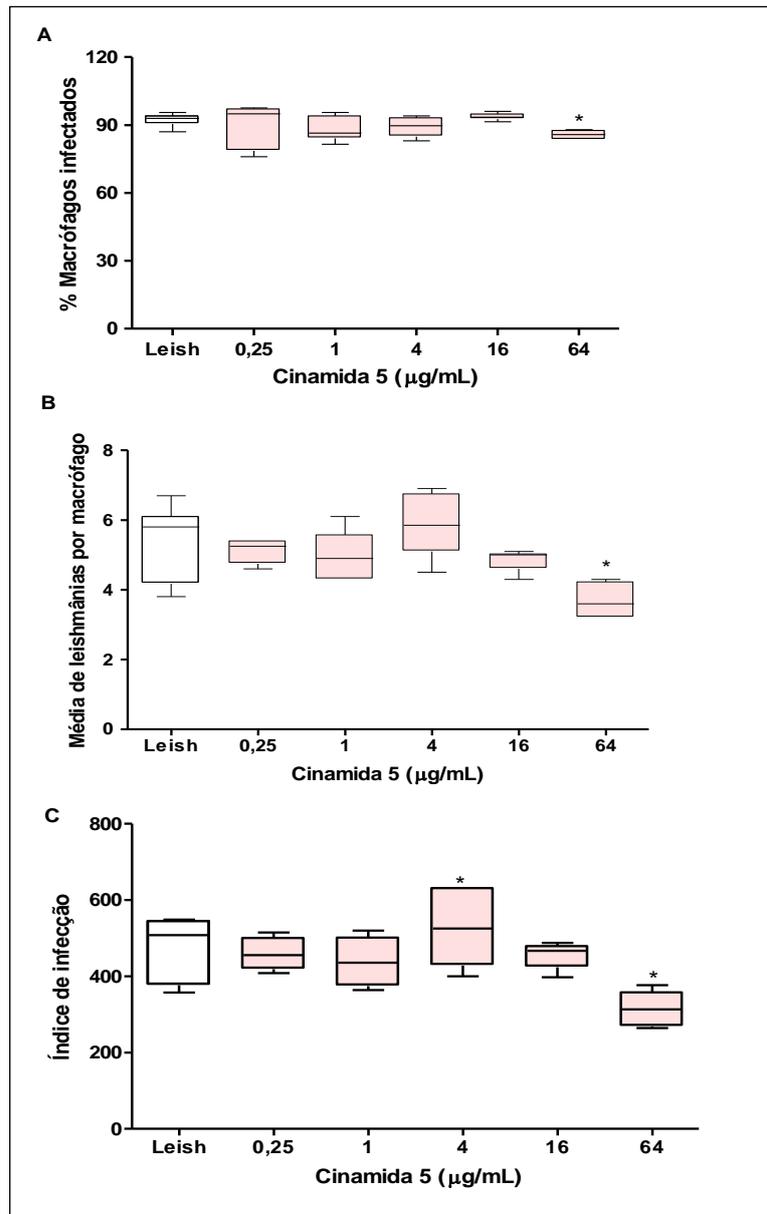


Figura 6. Efeito da cinamida 5 em cultivos de macrófagos peritoneais de camundongos swiss (n=6) infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis*. Em A, percentual de macrófagos infectados, em B média de leishmânias ingeridas por macrófagos e em C, índice de infecção. Os resultados normais foram avaliados pelo Teste t pareado e os não normais pelo teste de Wilcoxon. (*) valores considerados significativos quando comparados ao controle ($p < 0,05$). Os dados estão representados em medianas, quartis valores máximos e mínimos.

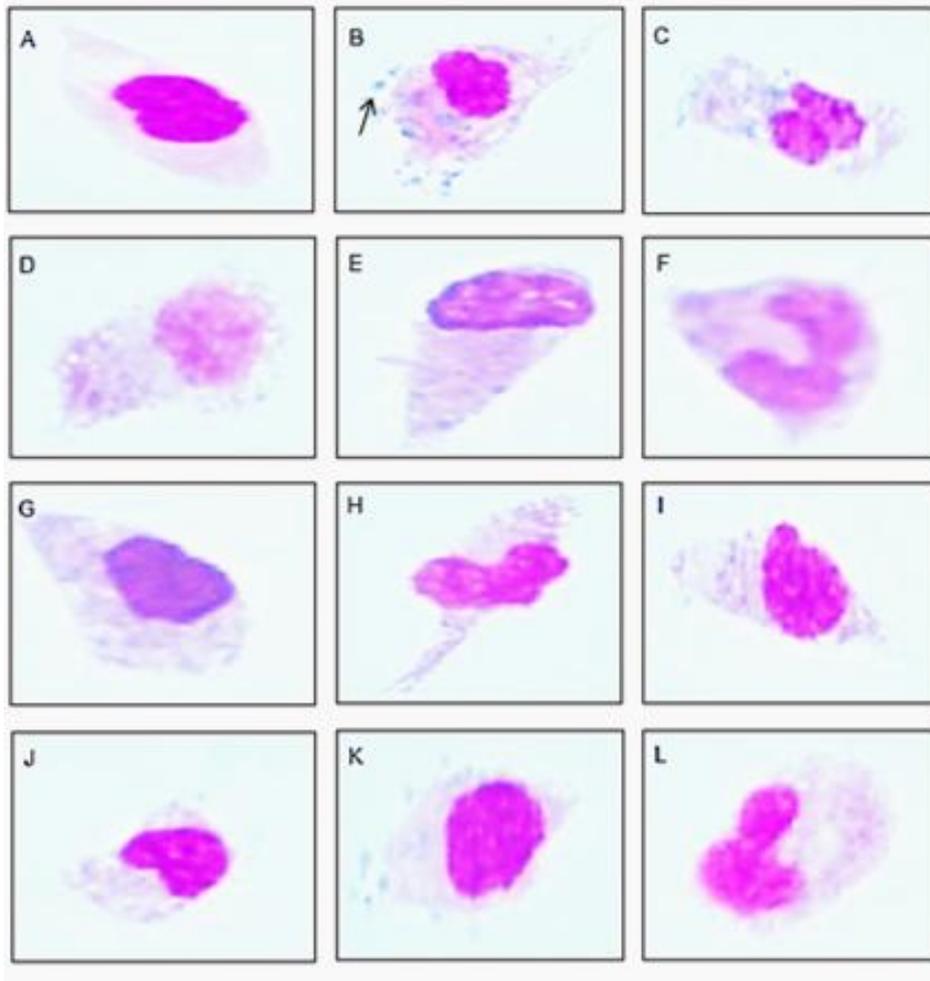


Figura 7. Fotomicrografia de macrófagos peritoneais infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com diferentes concentrações da piplartina e da cinamida 5. Macrófagos não infectados sem tratamento (A), macrófagos infectados sem tratamento (B), macrófagos infectados e tratados com 0,25 (C) ou 1 (D) ou 4 (E) ou 16 (F) ou 64 (G) $\mu\text{g/mL}$ da piplartina e macrófagos infectados e tratados com 0,25 (H) ou 1 (I) ou 4 (J) ou 16 (K) ou 64 (L) $\mu\text{g/mL}$ da cinamida 5. As células foram coradas com Giemsa a 10 %. Aumento 100x. A seta aponta para a leishmânia.

4.8. Avaliação do efeito da piplartina (1) e da cinamida 5 na aderência dos macrófagos peritoneais infectados ou não com *L. amazonensis*

Para avaliar a influência da piplartina (1) e da cinamida 5 na aderência dos macrófagos peritoneais, observou-se o percentual de macrófagos aderidos, infectados ou não, em 10 % da área da lamínula. Foram utilizadas 200.000 células peritoneais por escavação. No entanto, observou-se uma adesão no controle não tratado (macrófagos) de 7.210 células/lamínula.

Especificamente, para os grupos tratados com diferentes concentrações da piplartina (1) (Figura 8A), foi observado diminuição do percentual de células aderidas sobre as lamínulas em relação ao controle não tratado ($99,9 \pm 0,2$) (macrófagos não infectados) para 59 ± 5 com 0,25 $\mu\text{g/mL}$, para 61 ± 4 com 1 $\mu\text{g/mL}$, para 57 ± 13 com 4 $\mu\text{g/mL}$, para 59 ± 3 com 16 $\mu\text{g/mL}$ e para 51 ± 6 com 64 $\mu\text{g/mL}$ (Teste t pareado, $p < 0,05$). Dessa forma, o tratamento com a piplartina (1) reduziu a adesão celular com 0,25; 1; 4; 16 e 64 $\mu\text{g/mL}$ em 41 %, 39 %, 43 %, 41 % e 49 %, respectivamente.

Semelhantemente, para a cinamida 5 (Figura 8B), os resultados mostraram uma redução do percentual de células aderidas em relação ao controle não tratado ($99,9 \pm 0,2$) (macrófagos não infectados) para 67 ± 3 com 0,25 $\mu\text{g/mL}$, para 74 ± 2 com 1 $\mu\text{g/mL}$, para 64 ± 9 com 4 $\mu\text{g/mL}$, para 68 ± 4 com 16 $\mu\text{g/mL}$ e para 57 ± 7 com 64 $\mu\text{g/mL}$ (Teste t pareado, $p < 0,05$). Com isso, a cinamida 5 reduziu a adesão celular com 0,25; 1; 4; 16 e 64 $\mu\text{g/mL}$ em 33 %, 26 %, 36 %, 31 % e 43 %, respectivamente. Para o grupo macrófagos infectados com leishmânia observou-se uma diminuição da adesão em 16 % quando comparado ao grupo macrófagos não infectados.

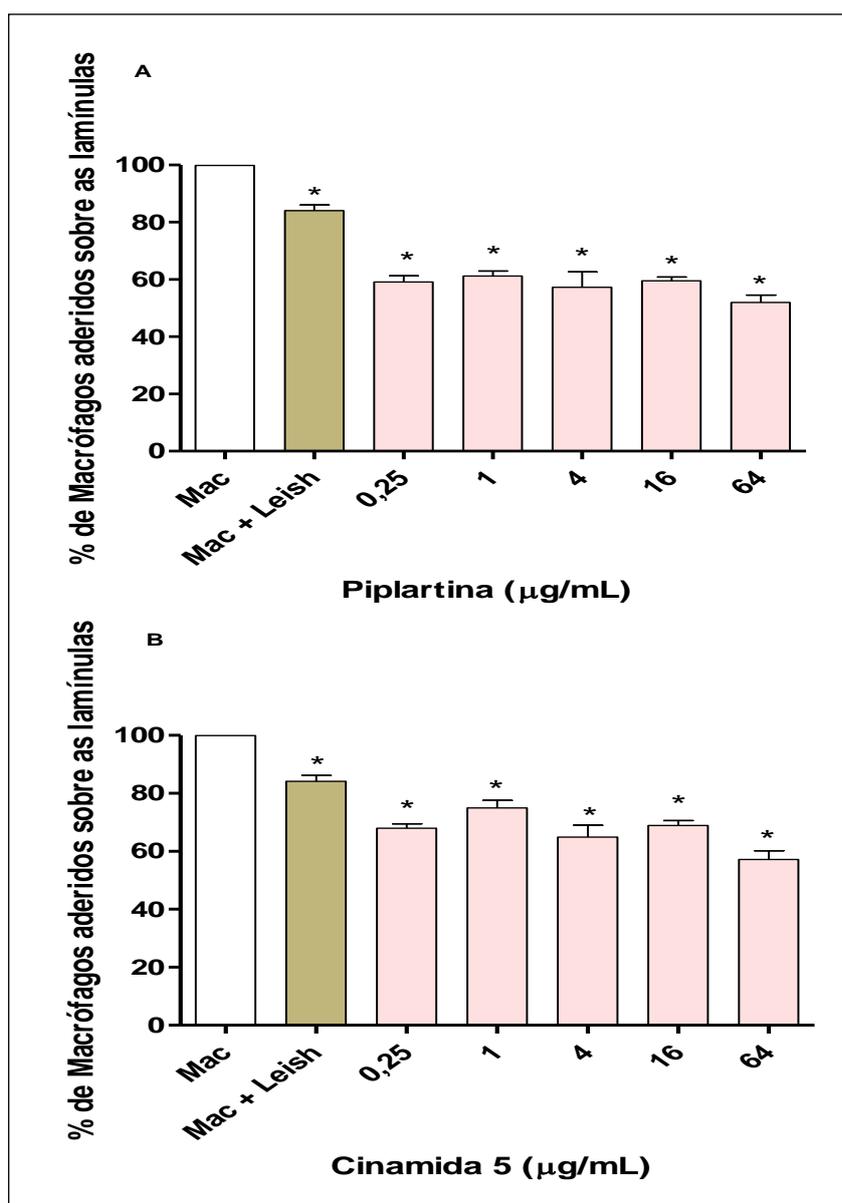


Figura 8. Efeito da piplartina (A) e da cinamida 5 (B) na aderência de macrófagos peritoneais de camundongos swiss, infectados ou não com *L. amazonensis* tratados ou não com diferentes concentrações (0,25, 1, 4, 16 e 64 µg/mL) da piplartina (A) e da cinamida 5 (B). (*) valores considerados significativos quando comparados ao controle (Teste t pareado; $p < 0,05$). Os dados estão representados em média e desvio padrão.

4.9. Avaliação do efeito da piplartina (1) e da cinamida 5 na aderência das células peritoneais dos camundongos Swiss

Para avaliar a influência da piplartina (1) e da cinamida 5 na aderência das células peritoneais, observou-se o percentual de células aderidas em 10 % da área da lamínula. Foram utilizadas 200.000 células por escavação. No ensaio utilizando a piplartina (1), observou-se uma adesão no controle não tratado (células peritoneais) de 15.756 células/lamínula. Entretanto, no ensaio utilizando a cinamida 5, a adesão no controle não tratado foi de 4.532 células/lamínula.

Os resultados mostraram que a incubação por 2 h das células peritoneais com as diferentes concentrações da piplartina (1) (Figura 9A) reduziu a média \pm DP do percentual de células aderidas sobre as lamínulas em relação ao controle não tratado ($99,9 \pm 0,2$) para 85 ± 10 com 1 $\mu\text{g/mL}$, para 87 ± 7 com 2 $\mu\text{g/mL}$, para 74 ± 13 com 4 $\mu\text{g/mL}$, para 82 ± 6 com 8 $\mu\text{g/mL}$, para 69 ± 6 com 16 $\mu\text{g/mL}$, para 76 ± 13 com 32 $\mu\text{g/mL}$ e para 77 ± 9 com 64 $\mu\text{g/mL}$ (Teste t pareado, $p < 0,05$). Não houve diferenças para as concentrações 0,25 e 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (83 ± 14) e 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (89 ± 10) (Teste t pareado, $p > 0,05$). Com isso, o tratamento com a piplartina com 1; 2; 4; 8; 16; 32 e 64 $\mu\text{g/mL}$ reduziu a adesão celular em 14 %, 12 %, 26 %, 18 %, 30 %, 23 % e 22 %, respectivamente.

Semelhantemente, para os grupos tratados com a cinamida 5 foi observado diminuição da média \pm DP do percentual de células aderidas sobre as lamínulas em relação ao controle não tratado ($99,9 \pm 0,2$) para 75 ± 12 com 1 $\mu\text{g/mL}$, para 76 ± 9 com 2 $\mu\text{g/mL}$, para 72 ± 17 com 4 $\mu\text{g/mL}$, para 77 ± 7 com 8 $\mu\text{g/mL}$ e para 88 ± 9 com 64 $\mu\text{g/mL}$ (Teste t pareado, $p < 0,05$). Não houve diferenças para as concentrações 0,25 $\mu\text{g/mL}$ (80 ± 19), 0,5 $\mu\text{g/mL}$ (87 ± 21), 16 $\mu\text{g/mL}$ (94 ± 10) e 32 $\mu\text{g/mL}$ (86 ± 21) (Teste t pareado, $p > 0,05$) (Figura 9B). Assim, o tratamento com a cinamida 5 com 1; 2; 4; 8 e 64 $\mu\text{g/mL}$ reduziu a adesão celular em 24 %, 23 %, 27 %, 22 % e 11 %, respectivamente.

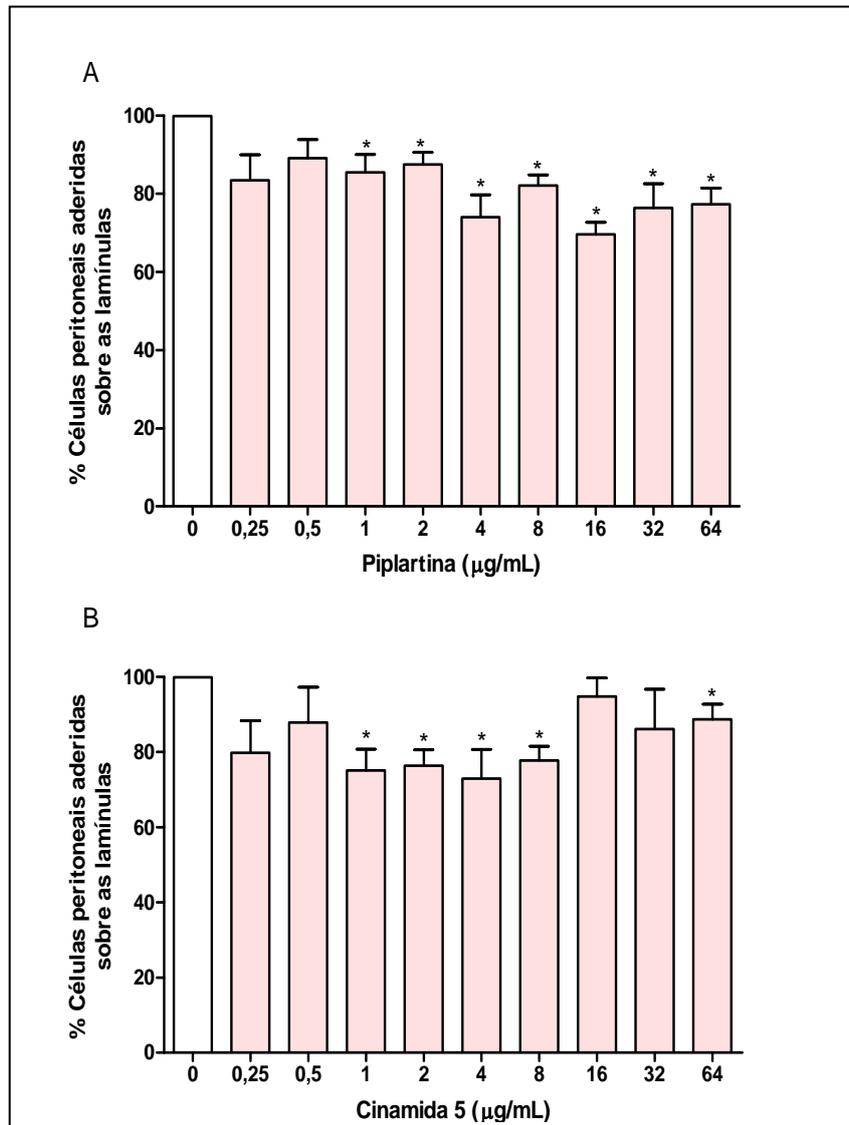


Figura 9. Efeito da piplartina (A) e da cinamida 5 (B) no percentual de aderência das células peritoneais de camundongos swiss. (*) valores considerados significativos quando comparados ao controle (Teste t pareado; $p < 0,05$). Os dados estão representados em média e desvio padrão.

4.10. Efeito da piplartina sobre a indução da morte celular em macrófagos peritoneais infectados ou não por *Leishmania*

Foi avaliado o percentual de células vivas, em apoptose inicial e em apoptose tardia/necrose nas células que foram infectadas ou não e tratadas ou não com diferentes concentrações (0,25; 1; 4; 16 e 64 µg/mL) da piplartina (1).

Os resultados mostraram que quando as células foram infectadas, tratadas com a piplartina (1) e coletadas do sobrenadante não houve diminuição do percentual de células vivas (células que não marcaram com a anexina nem com o iodeto de propídio) em relação ao controle não tratado e nem em relação ao controle leishmânia (Regressão linear, $p > 0,05$), mostrando um percentual de células vivas de 89,1 % com 0,25 µg/mL; 84,2 % com 1 µg/mL; 83,6 % com 4 µg/mL; 84,9 % com 16 µg/mL e 77,1 % com 64 µg/mL. Em relação ao controle não tratado observou-se 92,8 % de células vivas, para o controle leishmânia 81 %, para o controle DMSO 12,8 % e para o controle positivo H₂O₂ 30,8 % (Figura 10A).

Da mesma forma, não houve diferenças no percentual de células que estavam em apoptose inicial (células que marcaram somente com anexina) em relação ao controle não tratado e nem em relação ao controle leishmânia (Regressão linear, $p > 0,05$). Tem-se apoptose inicial em 7 % com 0,25 µg/mL; 9 % com 1 µg/mL; 10,2 % com 4 µg/mL; 8,8 % com 16 µg/mL e 13,5 % com 64 µg/mL. Para o controle não tratado observou-se 4,1 %, para o controle leishmânia 10,6 %, para o controle DMSO 43,8 % e para o controle positivo H₂O₂ 41,5 % (Figura 10A).

Também não ocorreram diferenças no percentual de células que estavam em apoptose tardia/necrose (células que marcaram com anexina e com iodeto de propídio) em relação ao controle não tratado e nem em relação ao controle leishmânia (Regressão linear, $p > 0,05$). Tem-se apoptose tardia/necrose em 3,7 % com 0,25 µg/mL; 6,3 % com 1 µg/mL; 5,7 % com 4 µg/mL; 6 % com 16 µg/mL e 8,8 % com 64 µg/mL. Já para o controle não

tratado observou-se 2,5 %, para o controle leishmânia 7,6 %, para o controle DMSO 43,2 % e para o controle positivo H₂O₂ 27,6 % (Figura 10A).

Semelhantemente, foi avaliado o percentual de células vivas, em apoptose inicial e em apoptose tardia/necrose das células que estavam aderidas sobre a placa de 96 escavações. Da mesma forma não houve diminuição do percentual de células vivas em relação ao controle não tratado (43,5 %) e nem em relação ao controle leishmânia (76,8 %) (Regressão linear, $p > 0,05$), mostrando um percentual de células vivas de 56,5 % com 0,25 µg/mL; 54,2 % com 1 µg/mL; 56,5 % com 4 µg/mL; 50,2 % com 16 µg/mL e 58,9 % com 64 µg/mL. Para os controles DMSO e H₂O₂ têm-se 50,3 % e 36,1 % de células vivas, respectivamente (Figura 10B).

Não houve diferenças no percentual de células que estavam em apoptose inicial em relação ao controle não tratado (26 %) e nem em relação ao controle leishmânia (5,7 %) (Regressão linear, $p > 0,05$). Tem-se apoptose inicial em 15,2 % com 0,25 µg/mL; 17,2 % com 1 µg/mL; 16,4 % com 4 µg/mL; 21 % com 16 µg/mL e 16,6 % com 64 µg/mL. Para o controle DMSO 12,7 % e para o controle positivo H₂O₂ 28 % (Figura 10B).

Também não ocorreram diferenças no percentual de células que estavam em apoptose tardia/necrose em relação ao controle não tratado (24,2 %) e nem em relação ao controle leishmânia (8,7 %) (Regressão linear, $p > 0,05$). Tem-se apoptose tardia/necrose em 19,3 % com 0,25 µg/mL; 21,7 % com 1 µg/mL; 20 % com 4 µg/mL; 22,7 % com 16 µg/mL e 16,5 % com 64 µg/mL. Já para o controle DMSO 29,6 % e para o controle positivo H₂O₂ 29 % (Figura 10B).

As imagens obtidas referentes às células do sobrenadante e as células aderidas são mostradas nas figuras 11 e 12, respectivamente.

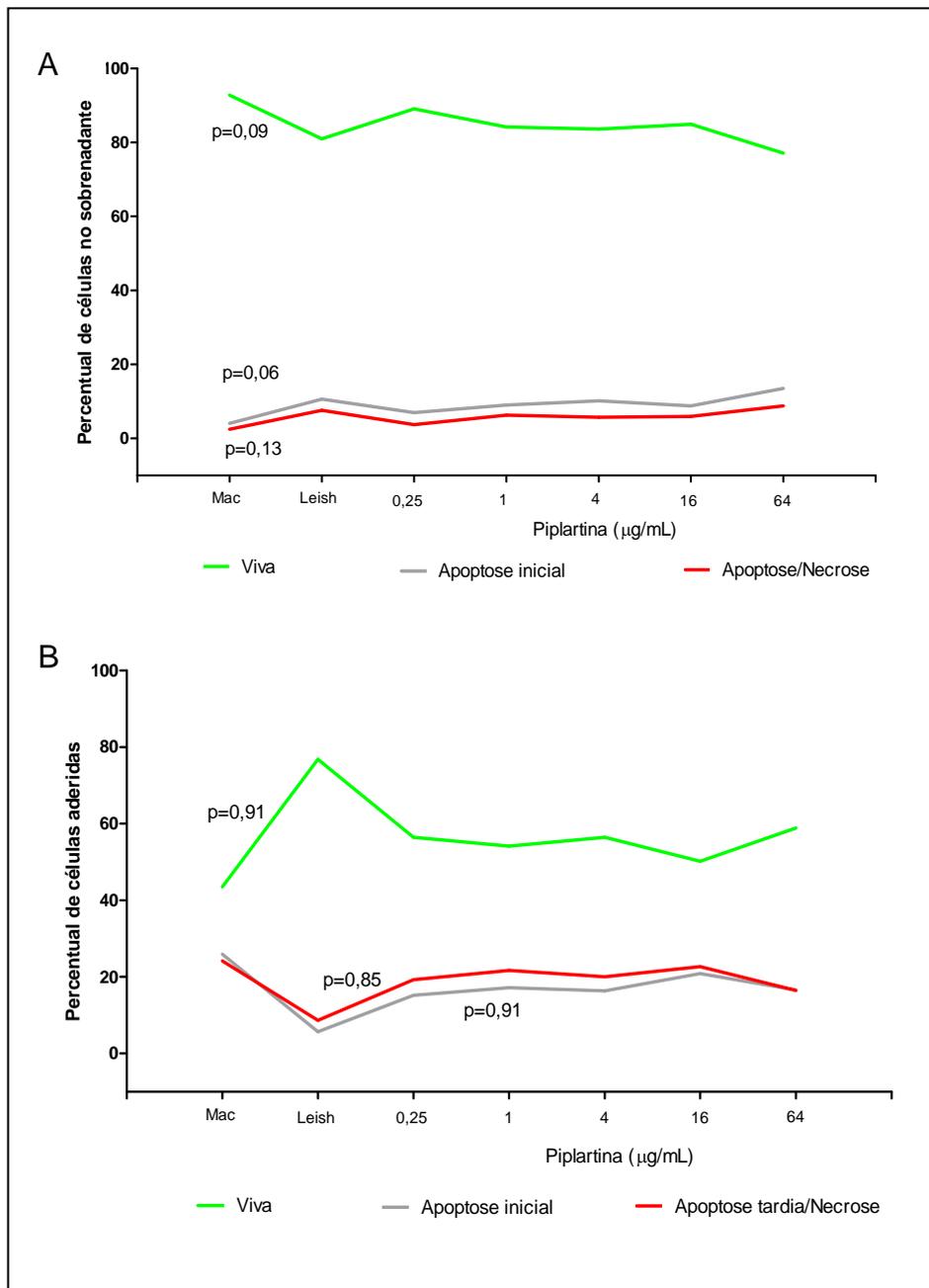


Figura 10. Efeito das diferentes concentrações da piplartina sobre a indução de morte celular de macrófagos peritoneais de camundongos swiss infectados ou não com *L. amazonensis*. Em A percentual de células vivas, em apoptose inicial e em apoptose tardia/necrose avaliadas do sobrenadante dos cultivos. Em B percentual de células vivas, em apoptose inicial e em apoptose tardia/necrose que estavam aderidas sobre a placa de 96 escavações dos cultivos. Regressão Linear, valores considerados significativos quando $p < 0,05$).

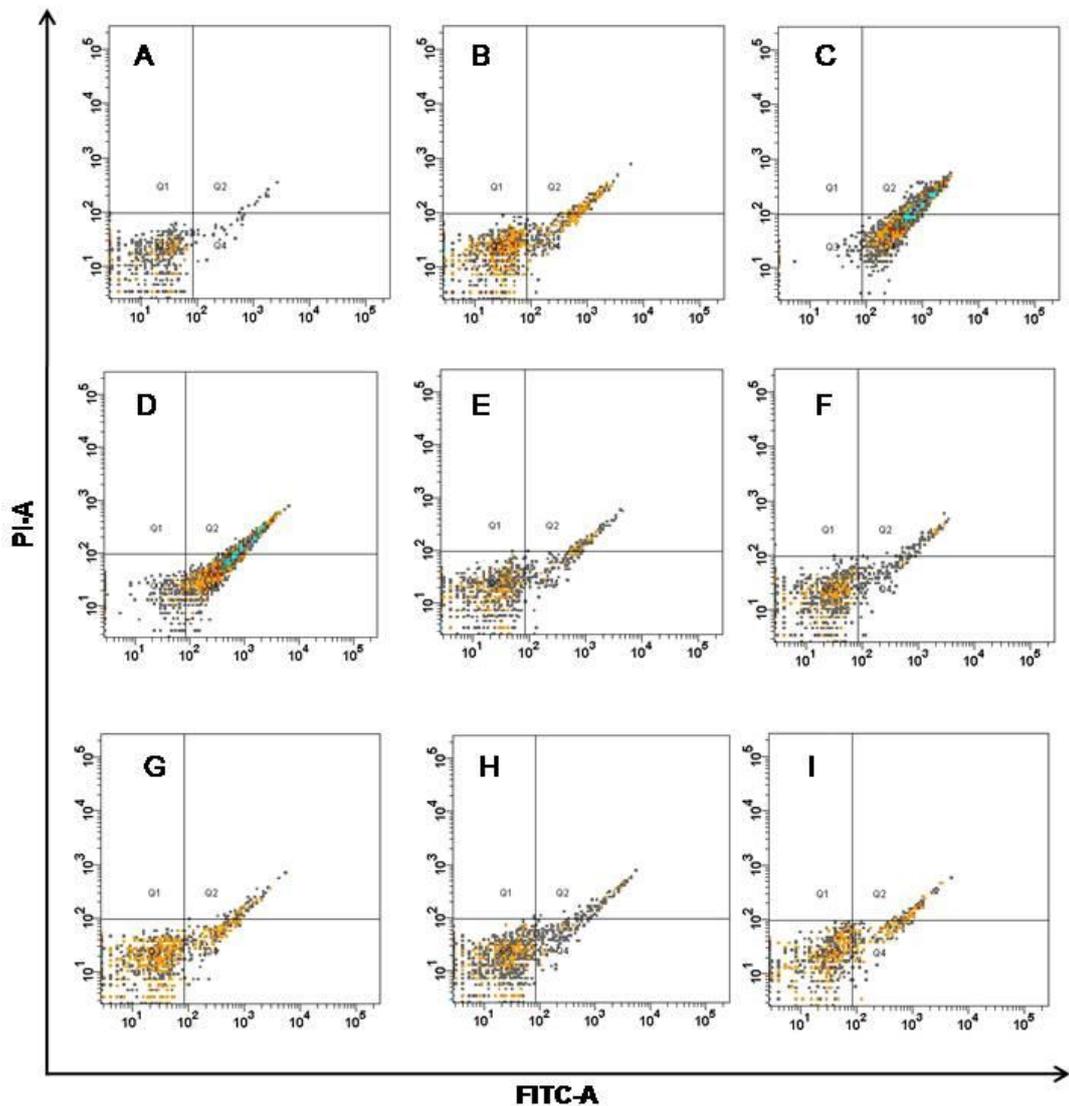


Figura 11. Macrófagos peritoneais de camundongos swiss marcados ou não com anexina e iodeto de propídio, que estavam no sobrenadante dos cultivos, infectados ou não com *L. amazonensis* e tratados com diferentes concentrações (0,25; 1; 4; 16 e 64 $\mu\text{g/mL}$) da piplartina. Controle basal (A), Controle leishmânia (B), Controle DMSO (C), Controle H_2O_2 (D), 0,25 $\mu\text{g/mL}$ (E), 1 $\mu\text{g/mL}$ (F), 4 $\mu\text{g/mL}$ (G), 16 $\mu\text{g/mL}$ (H) e 64 $\mu\text{g/mL}$ (I). Q2 (Apoptose tardia/necrose - An^+PI^+), Q3 (Célula viva - An^-PI^-) e Q4 (Apoptose inicial - An^+PI^-), por citometria de fluxo.

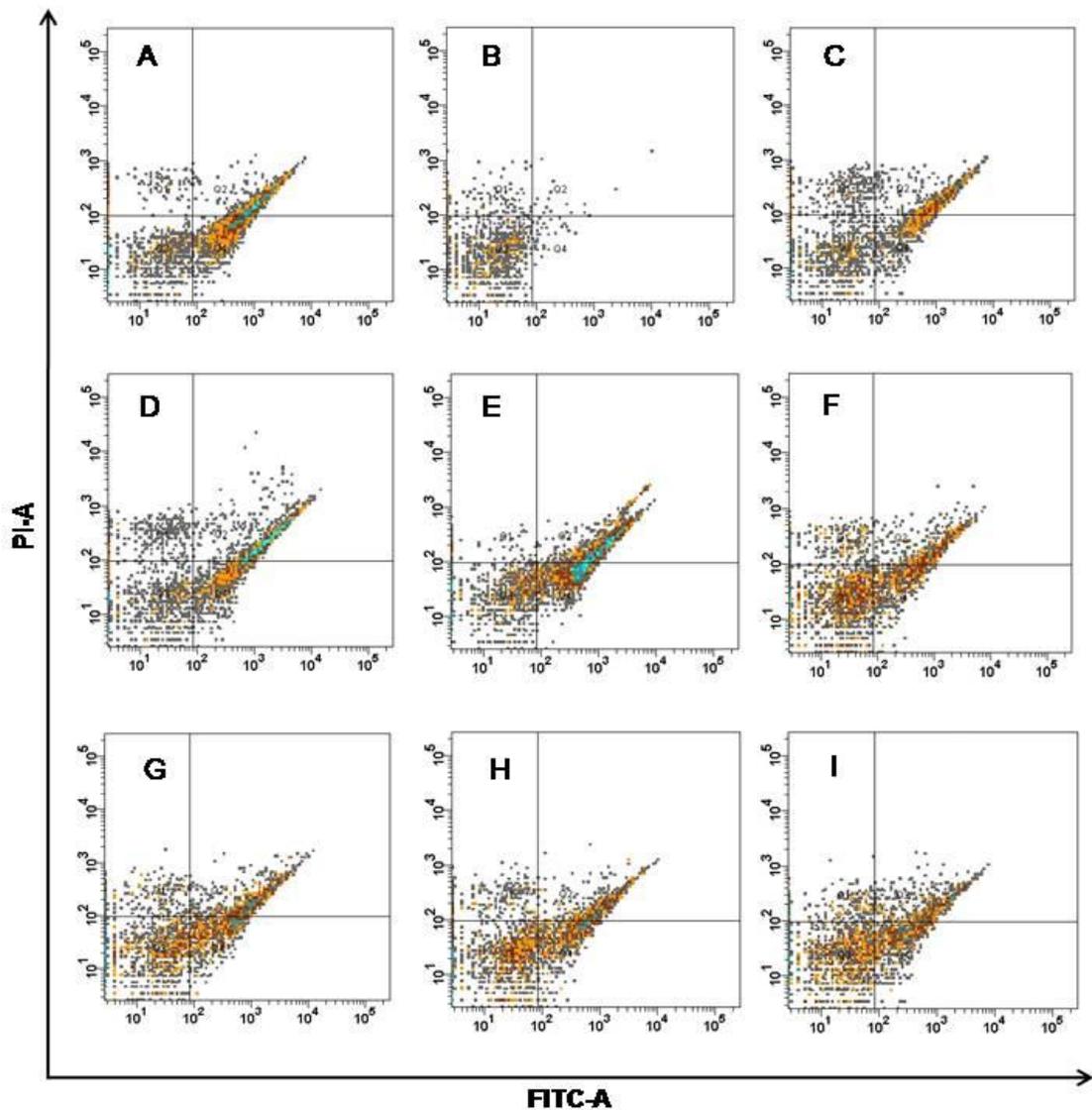


Figura 12. Macrófagos peritoneais de camundongos swiss marcados ou não com anexina e iodeto de propídio, que estavam aderidos sobre a placa de 96 escavações, infectados ou não com *L. amazonensis* e tratados com diferentes concentrações (0,25; 1; 4; 16 e 64 $\mu\text{g/mL}$) da pipartina. Controle basal (A), Controle leishmânia (B), Controle DMSO (C), Controle H_2O_2 (D), 0,25 $\mu\text{g/mL}$ (E), 1 $\mu\text{g/mL}$ (F), 4 $\mu\text{g/mL}$ (G), 16 $\mu\text{g/mL}$ (H) e 64 $\mu\text{g/mL}$ (I). Q2 (Apoptose tardia/necrose - An^+PI^+), Q3 (Célula viva - An^-PI^-) e Q4 (Apoptose inicial - An^+PI^-), por citometria de fluxo.

4.11. Efeito da cinamida 5 sobre a indução da morte celular em macrófagos peritoneais infectados ou não por *Leishmania*

Foi avaliado o percentual de células vivas, em apoptose inicial e em apoptose tardia/necrose nas células que foram infectadas ou não e tratadas ou não com diferentes concentrações (0,25; 1; 4; 16 e 64 µg/mL) da cinamida 5.

Os resultados mostraram que quando as células foram infectadas, tratadas e coletadas do sobrenadante dos cultivos não houve diminuição do percentual de células vivas em relação ao controle não tratado (82,8 %) e nem em relação ao controle leishmânia (84,3 %) (Regressão linear, $p > 0,05$), mostrando um percentual de células vivas de 80 % com 0,25 µg/mL; 83,4 % com 1 µg/mL; 81,3 % com 4 µg/mL; 84,8 % com 16 µg/mL e 85,6 % com 64 µg/mL. Em relação ao controle DMSO 8,6 % e ao controle positivo H₂O₂ 29,7 % (Figura 13A).

Da mesma forma, não houve diferenças no percentual de células que estavam em apoptose inicial em relação ao controle não tratado (9,9 %) e nem em relação ao controle leishmânia (8,6 %) (Regressão linear, $p > 0,05$). Tem-se apoptose inicial em 11,3 % com 0,25 µg/mL; 9,2 % com 1 µg/mL; 10,2 % com 4 µg/mL; 7,9 % com 16 µg/mL e 7 % com 64 µg/mL. Para o controle DMSO 34,1 % e para o controle positivo H₂O₂ 36,1 % (Figura 13A).

Também não ocorreram diferenças no percentual de células que estavam em apoptose tardia/necrose em relação ao controle não tratado (6,3 %) e nem em relação ao controle leishmânia (6,5 %) (Regressão linear, $p > 0,05$). Tem-se apoptose tardia/necrose em 8,1 % com 0,25 µg/mL; 6,9 % com 1 µg/mL; 7,9 % com 4 µg/mL; 6,5 % com 16 µg/mL e 6,6 % com 64 µg/mL. Já para o controle DMSO 56,9 % e para o controle positivo H₂O₂ 34 % (Figura 13A).

Em relação às células que estavam aderidas sobre a placa, que haviam sido infectadas e tratadas com a cinamida 5, os resultados mostraram uma diminuição do percentual de células vivas em 67,2 % com 0,25 µg/mL; 65,7 % com 1 µg/mL; 67,5 % com 4 µg/mL; 66,9 % com 16

$\mu\text{g/mL}$ e 67,3 % com 64 $\mu\text{g/mL}$ quando comparadas ao controle não tratado (92,2 %) e ao controle leishmânia (86,4 %) (Regressão linear, $p < 0,05$). Em relação ao controle DMSO e ao controle positivo H_2O_2 foi observado 87,7 % e 67,2 % de células vivas, respectivamente (Figura 13B).

Com relação às células que estão em apoptose inicial, observou-se uma tendência a ocorrer esse tipo de morte celular quando comparamos o controle não tratado (0,2 %) e o controle leishmânia (4 %) com as células que foram infectadas e tratadas (Regressão linear, $p = 0,05$). Tem-se apoptose inicial em 11 % com 0,25 $\mu\text{g/mL}$; 10,8 % com 1 $\mu\text{g/mL}$; 9,1 % com 4 $\mu\text{g/mL}$; 10 % com 16 $\mu\text{g/mL}$ e 10,4 % com 64 $\mu\text{g/mL}$. Para o controle DMSO 5,6 % e para o controle positivo H_2O_2 16,9 % (Figura 13B).

Da mesma forma, para as células que estão em apoptose tardia/necrose, os resultados mostram um aumento desse tipo de morte celular quando comparamos o controle não tratado (0,1 %) e o controle leishmânia (4,4 %) as células que foram infectadas e tratadas (Regressão linear, $p < 0,05$). Tem-se apoptose tardia/necrose em 12,6 % com 0,25 $\mu\text{g/mL}$; 14,7 % com 1 $\mu\text{g/mL}$; 14,4 % com 4 $\mu\text{g/mL}$; 14,6 com 16 $\mu\text{g/mL}$ e 14,4 % com 64 $\mu\text{g/mL}$. Para o controle DMSO 5,9 % e para o controle positivo H_2O_2 14,2 % (Figura 13B).

As imagens obtidas referentes às células do sobrenadante e as células aderidas são mostradas nas figuras 14 e 15, respectivamente.

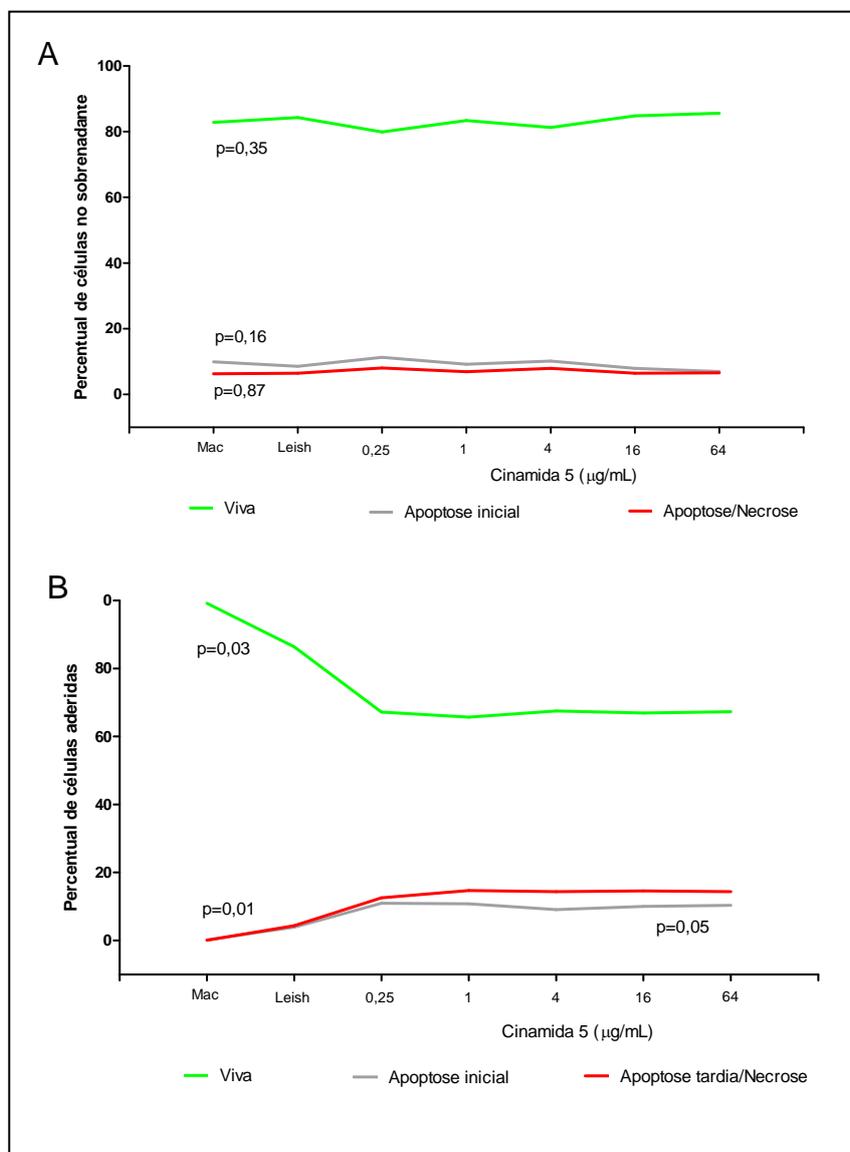


Figura 13. Efeito das diferentes concentrações cinamida 5 sobre a indução de morte celular de macrófagos peritoneais de camundongos swiss infectados ou não com *L. amazonensis*. Em A percentual de células vivas, em apoptose inicial e em apoptose tardia/necrose avaliadas do sobrenadante dos cultivos. Em B percentual de células vivas, em apoptose inicial e em apoptose tardia/necrose que estavam aderidas sobre a placa de 96 escavações dos cultivos. Regressão Linear, valores considerados significativos quando $p < 0,05$).

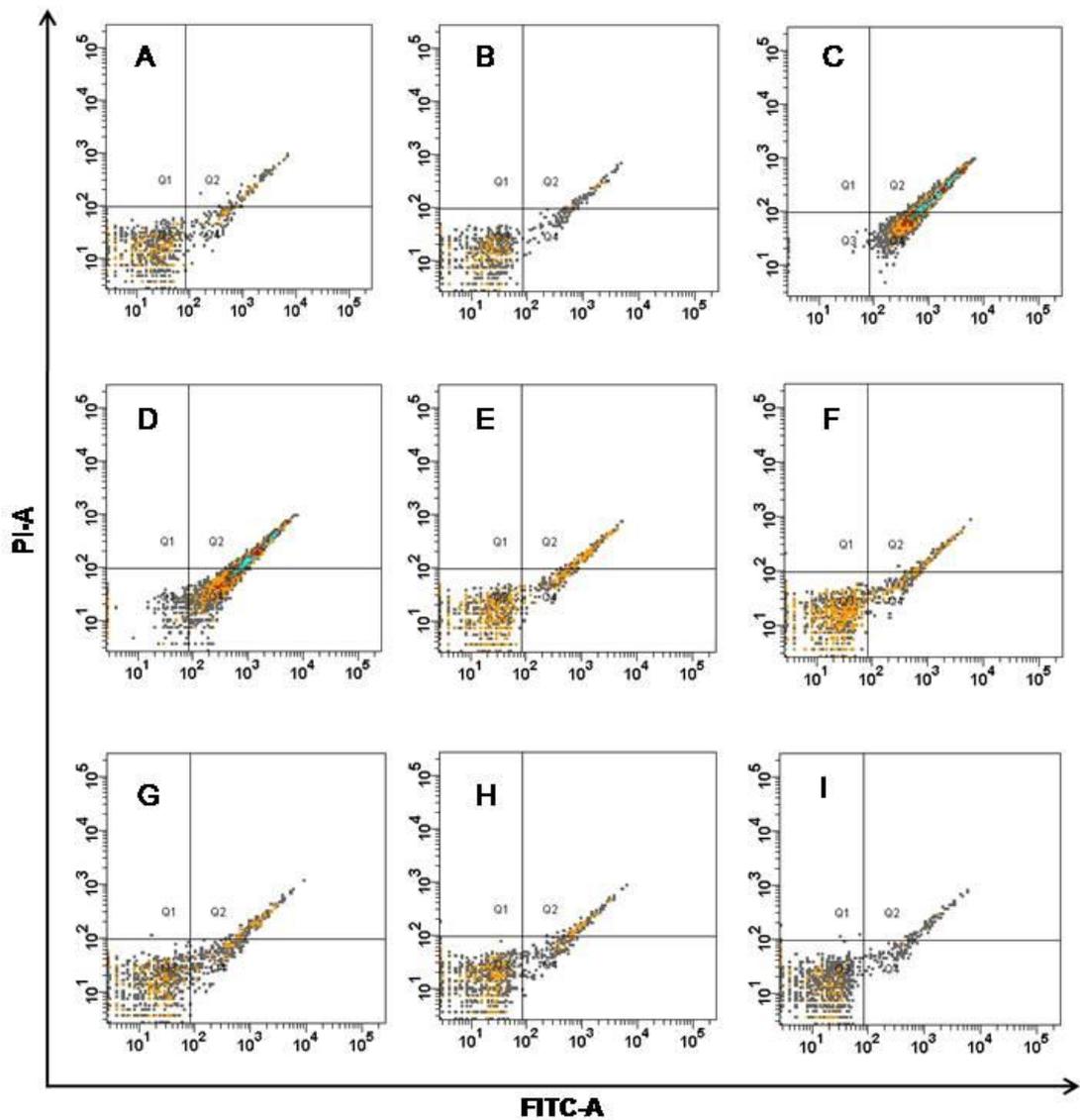


Figura 14. Macrófagos peritoneais de camundongos swiss marcados ou não com anexina e iodeto de propídio, que estavam no sobrenadante dos cultivos, infectados ou não com *L. amazonensis* e tratados com diferentes concentrações (0,25; 1; 4; 16 e 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$) da cinamida 5. Controle basal (A), Controle leishmânia (B), Controle DMSO (C), Controle H_2O_2 (D), 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (E), 1 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (F), 4 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (G), 16 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (H) e 64 $\mu\text{g}/\text{mL}$ (I). Q2 (Apoptose tardia/necrose - An^+PI^+), Q3 (Célula viva - An^-PI^+) e Q4 (Apoptose inicial - An^+PI^-), por citometria de fluxo.

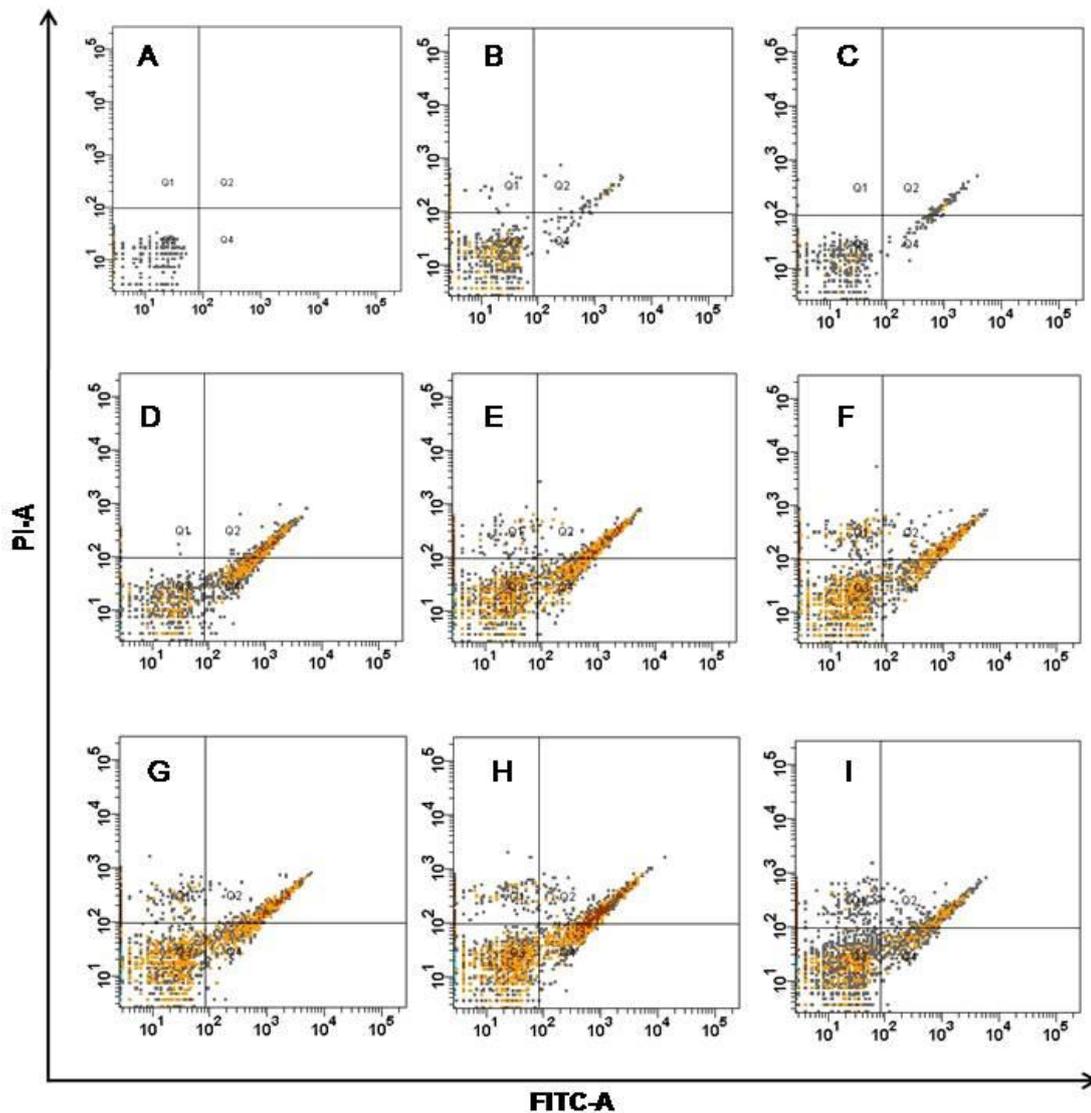


Figura 15. Macrófagos peritoneais de camundongos swiss marcados ou não com anexina e iodeto de propídio, que estavam aderidos sobre a placa de 96 escavações, infectados ou não com *L. amazonensis* e tratados com diferentes concentrações (0,25; 1; 4; 16 e 64 $\mu\text{g/mL}$) da cinamida 5. Controle basal (A), Controle leishmânia (B), Controle DMSO (C), Controle H_2O_2 (D), 0,25 $\mu\text{g/mL}$ (E), 1 $\mu\text{g/mL}$ (F), 4 $\mu\text{g/mL}$ (G), 16 $\mu\text{g/mL}$ (H) e 64 $\mu\text{g/mL}$ (I). Q2 (Apoptose tardia/necrose - An^+PI^+), Q3 (Célula viva - An^-PI^-) e Q4 (Apoptose inicial - An^+PI^-), por citometria de fluxo.

4.12. Quantificação de peróxido de hidrogênio em cultivos de macrófagos peritoneais de camundongos infectados ou não com *L. amazonensis*

A produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) por macrófagos peritoneais de camundongos infectados com *L. amazonensis* e tratados com diferentes concentrações da piplartina (**1**) e da cinamida **5** foi avaliada no sobrenadante dos cultivos utilizando o marcador de pH 3,5,3'5'-tetrametilbenzidine (TMB) na presença de peroxidase.

Os resultados mostraram que o grupo tratado com 4 $\mu\text{g/mL}$ da piplartina apresentou uma redução de 99,3 % na produção de H_2O_2 em relação ao controle RPMI 1640 (Wilcoxon, $p=0,05$). No entanto, para o grupo tratado com 16 $\mu\text{g/mL}$ existe uma tendência a inibir a produção em relação ao controle não tratado (Wilcoxon, $p=0,07$). Para as demais concentrações (0,25; 1; e 64 $\mu\text{g/mL}$) não foi observado diferenças (Wilcoxon, $p>0,05$)(Figura 16A).

Semelhantemente, para os cultivos tratados com as diferentes concentrações (0,25; 1; 4; 16 e 64 $\mu\text{g/mL}$) da cinamida **5** não houve diferença em relação ao controle não tratado (Wilcoxon, $p>0,05$). As células estimuladas com PMA (controle positivo) apresentaram um aumento de 87 % na produção de H_2O_2 em comparação ao RPMI 1640 (controle negativo) (Wilcoxon, $p<0,05$). Porém, o controle leishmânia não diferiu do controle RPMI 1640 (Wilcoxon, $p>0,05$)(Figura 16B).

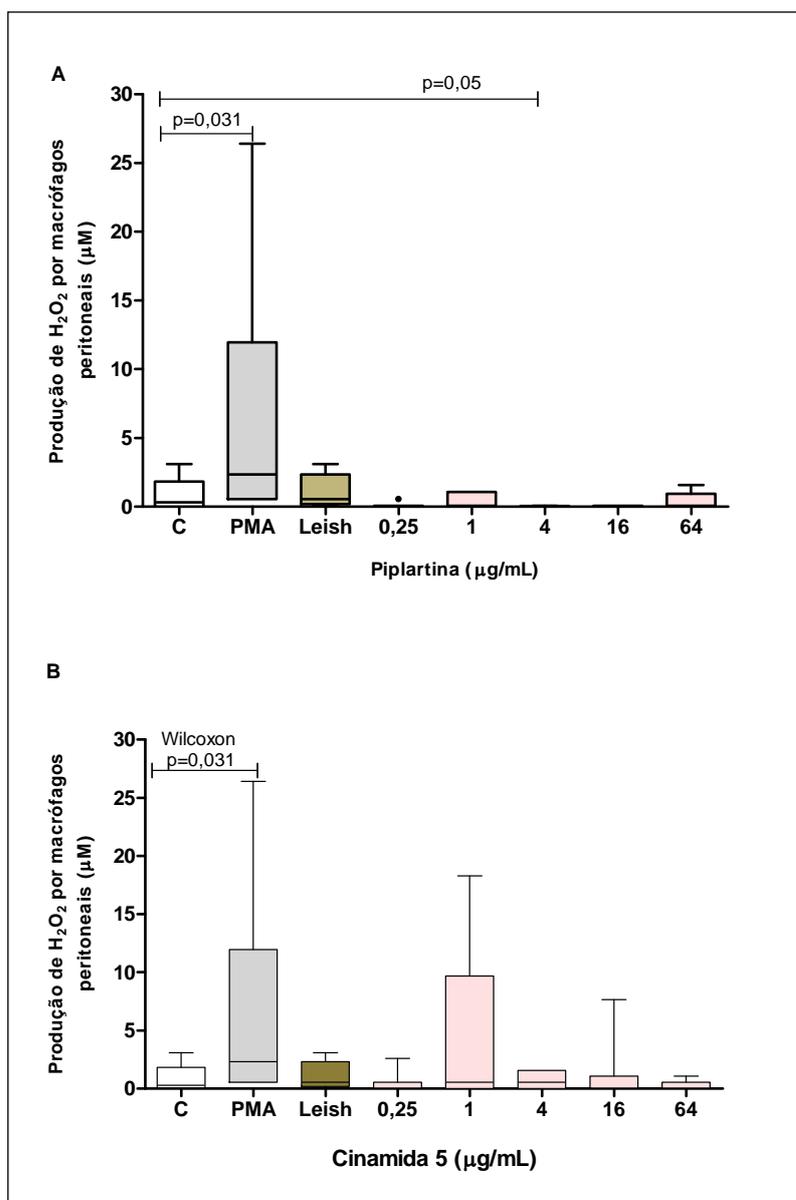


Figura 16. Produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais de camundongos swiss (n=6) infectados ou não com *L. amazonensis* tratados ou não com diferentes concentrações (0,25; 1; 4; 16 e 64 µg/mL) da piplartina (A) e da cinamida 5 (B). Os resultados foram analisados pelo teste Wilcoxon, considerando os valores significativos quando $p < 0,05$. Os dados estão representados em medianas, quartis valores máximos e mínimos. (●) Representa a amostra com variabilidade, avaliada pelo teste de Tukey.

4.13. Quantificação de óxido nítrico em cultivos de macrófagos peritoneais de camundongos infectados ou não com *L. amazonensis*

A produção de óxido nítrico (NO) por macrófagos peritoneais de camundongos infectados com *L. amazonensis* foi avaliada pela quantificação de nitrito no sobrenadante dos cultivos utilizando o reagente de Greiss.

Os resultados mostraram que nos cultivos tratados com 1 µg/mL da piplartina (**1**) ocorre uma tendência a aumentar a produção de NO em relação ao controle não tratado (Wilcoxon, $p=0,0819$). No entanto, com 16 µg/mL ocorre um aumento de 46,8 % na produção de NO em relação ao controle RPMI 1640 (Wilcoxon, $p=0,046$). Para as demais concentrações (0,25; 4 e 64 µg/mL) não foi observado diferenças (Wilcoxon, $p>0,05$)(Figura 17A).

Da mesma forma, nos cultivos tratados com a cinamida **5** com 0,25 µg/mL houve um aumento de 46,8 % a produção de NO em relação ao controle RPMI 1640 (Wilcoxon, $p=0,031$). As células estimuladas com LPS (controle positivo) apresentaram um aumento de 34 % na produção de NO em comparação ao RPMI 1640 (controle negativo) (Wilcoxon, $p=0,012$). Porém, o controle leishmânia e as demais concentrações não diferiram do controle RPMI 1640 (Wilcoxon, $p>0,05$)(Figura 17B).

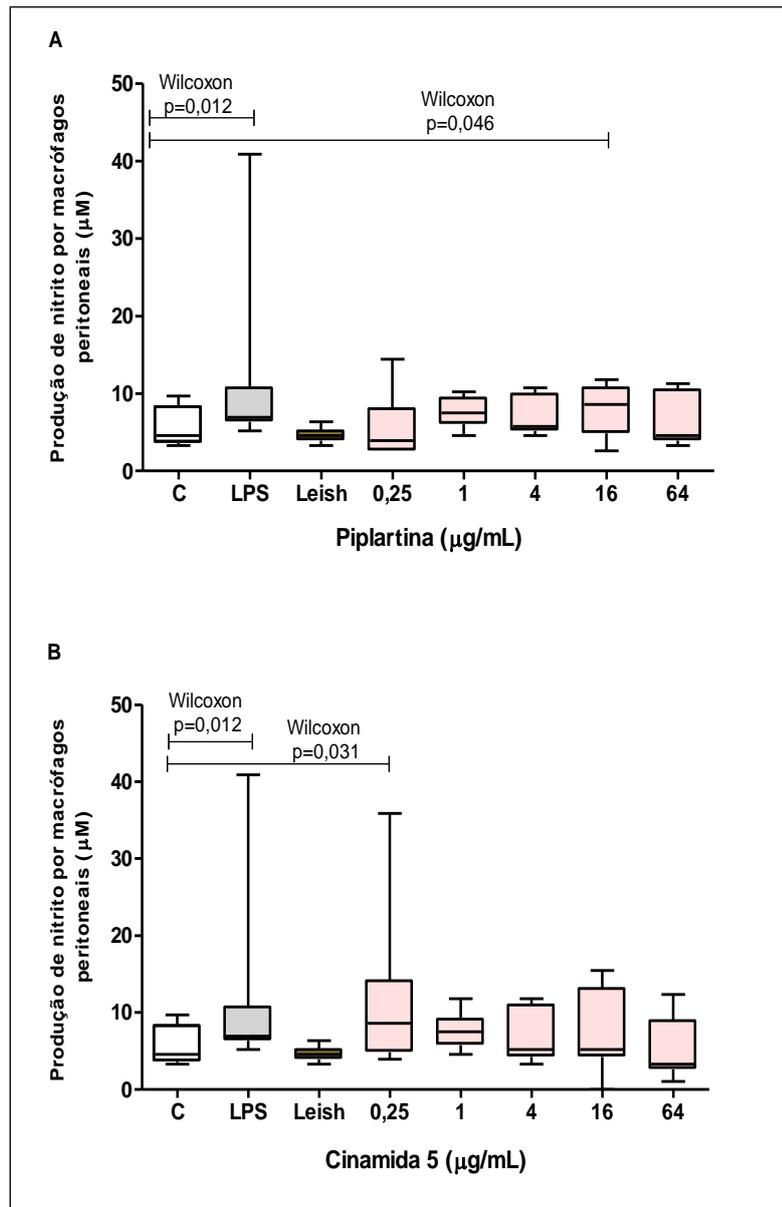


Figura 17. Produção de nitrito por macrófagos peritoneais de camundongos swiss (n=6) infectados ou não com *L. amazonensis* e tratados ou não com diferentes concentrações (0,25; 1; 4; 16 e 64 $\mu\text{g/mL}$) da piplartina (A) e da cinamida 5 (B). Os resultados foram analisados pelo teste Wilcoxon, considerando os valores significativos quando $p < 0,05$. Os dados estão representados em medianas, quartis valores máximos e mínimos.

4.14. Efeito da piplartina (1) e da cinamida 5 sobre a formação de corpúsculos lipídicos por macrófagos infectados ou não por *Leishmania*

Para avaliar a formação de corpúsculos lipídicos por macrófagos infectados ou não com *L. amazonensis* e tratados ou não com a piplartina (1) e a cinamida 5 foi realizada a coloração com óleo vermelho.

Para os cultivos de macrófagos infectados e tratados com a piplartina (1), os resultados mostraram que o percentual de macrófagos com corpúsculos lipídicos diminuiu quando se compara o controle macrófago infectado com *Leishmania* ($78,7 \pm 3,7$) com os macrófagos infectados e tratados com 64 $\mu\text{g/mL}$ ($31,4 \pm 21,5$). Em contrapartida, foi observado um aumento do percentual de macrófagos com corpúsculos lipídicos quando se compara o controle macrófago ($3 \pm 3,2$) ao controle LPS ($76,2 \pm 5,2$), ao controle macrófago infectado com *Leishmania* ($78,7 \pm 3,7$), e aos macrófagos infectados e tratados com 0,25 $\mu\text{g/mL}$ ($83 \pm 4,6$), 1 $\mu\text{g/mL}$ (79 ± 9), 4 $\mu\text{g/mL}$ (80 ± 10), 16 $\mu\text{g/mL}$ ($76,5 \pm 8$) e 64 $\mu\text{g/mL}$ ($31,4 \pm 21,5$) (Anova seguido por Student Newman-Keuls, $p < 0,05$) (Figura 18A).

Com relação à média de corpúsculos lipídicos por macrófagos, os resultados indicam que houve um aumento apenas para os macrófagos infectados e tratados com 0,25 $\mu\text{g/mL}$ ($10,3 \pm 2$) em relação ao controle macrófago infectado com *Leishmania* ($6,6 \pm 1$). Também foi observado um aumento dessa média nos macrófagos infectados e tratados com 0,25 $\mu\text{g/mL}$ ($10,3 \pm 2$) e com 1 $\mu\text{g/mL}$ (8 ± 3) quando comparado ao controle macrófago (4 ± 3) (Anova seguido por Student Newman-Keuls, $p < 0,05$) (Figura 18B).

Semelhantemente, para o índice corpuscular, os resultados mostraram que houve uma diminuição desse índice nos macrófagos infectados e tratados com 64 $\mu\text{g/mL}$ (217 ± 153) e um aumento com 0,25 $\mu\text{g/mL}$ (859 ± 159) comparado ao controle macrófago infectado com *Leishmania* (525 ± 105) (Anova seguido por Student Newman-Keuls, $p < 0,05$). Quando comparado ao controle macrófago ($16,5 \pm 15$), foi

observado um aumento desse índice para o controle LPS (413 ± 74), para o controle macrófago infectado com *Leishmania* (525 ± 105), e para os macrófagos infectados e tratados com $0,25 \mu\text{g/mL}$ (859 ± 159), $1 \mu\text{g/mL}$ (616 ± 153) e $4 \mu\text{g/mL}$ (494 ± 52) $16 \mu\text{g/mL}$ (447 ± 38) e $64 \mu\text{g/mL}$ (217 ± 153) (Anova seguido por Student Newman-Keuls, $p < 0,05$) (Figura 18C).

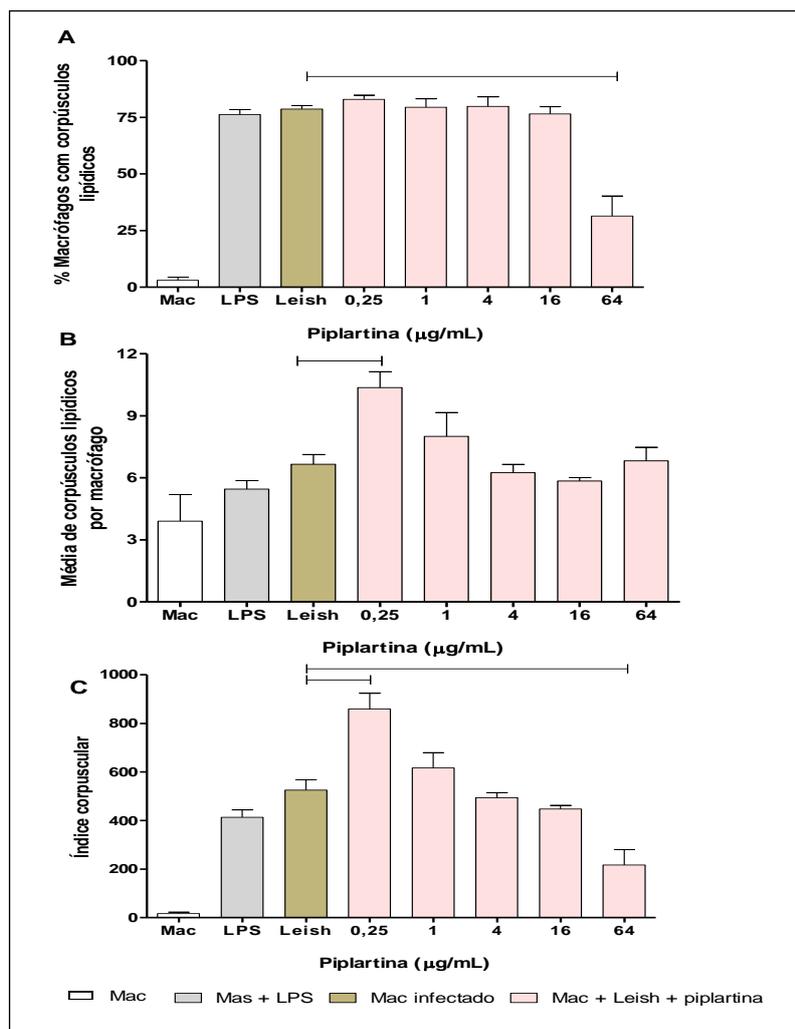


Figura 18. Efeito da piplartina na formação de corpúsculos lipídicos em cultivos de macrófagos peritoneais de camundongos swiss infectados ou não com *L. amazonensis*. Em A, % de macrófagos com corpúsculos lipídicos, em B média de corpúsculos lipídicos por macrófagos, em C índice corpuscular. (—) valores considerados significativos quando comparados ao controle macrófago infectado

com leishmânia (Anova seguido por Student Newman-Keuls, $p < 0,05$). Os dados estão representados em média e desvio padrão.

Os resultados mostraram que para os cultivos de macrófagos infectados e tratados com a cinamida **5**, o percentual de macrófagos com corpúsculos lipídicos aumentou quando se compara o controle macrófago infectado com *Leishmania* ($78,5 \pm 4$) com os macrófagos infectados e tratados com $0,25 \mu\text{g/mL}$ ($87 \pm 4,3$), $1 \mu\text{g/mL}$ ($89,3 \pm 4$), $4 \mu\text{g/mL}$ (90 ± 4) e $16 \mu\text{g/mL}$ ($89 \pm 4,5$) (Anova seguido por Student Newman-Keuls, $p < 0,05$). Também foi observado um aumento do percentual de macrófagos com corpúsculos lipídicos em relação ao controle macrófago (3 ± 3) para o controle LPS (76 ± 5), para o controle macrófago infectado com *Leishmania* ($78,5 \pm 4$), e para os macrófagos infectados e tratados com $0,25 \mu\text{g/mL}$ (87 ± 4), $1 \mu\text{g/mL}$ (89 ± 4), $4 \mu\text{g/mL}$ (89 ± 4), $16 \mu\text{g/mL}$ ($89 \pm 4,5$) e $64 \mu\text{g/mL}$ (79 ± 7) (Anova seguido por Student Newman-Keuls, $p < 0,05$) (Figura 19A).

Com relação à média de corpúsculos lipídicos por macrófagos, os resultados indicam que não houve diferenças quando comparado o controle macrófago infectado com *Leishmania* aos macrófagos infectados e tratados (Anova seguido por Student Newman-Keuls, $p > 0,05$). Em contrapartida, houve um aumento da média de corpúsculos lipídicos em comparação ao controle macrófago (4 ± 3) para o controle macrófago infectado com *Leishmania* ($6,5 \pm 1$), macrófagos infectados e tratados com $0,25 \mu\text{g/mL}$ ($7 \pm 0,5$), $1 \mu\text{g/mL}$ ($6,5 \pm 0,5$), $4 \mu\text{g/mL}$ ($6 \pm 0,5$), $16 \mu\text{g/mL}$ (8 ± 1) e $64 \mu\text{g/mL}$ ($6,5 \pm 1,5$) (Anova seguido por Student Newman-Keuls, $p < 0,05$) (Figura 19B).

Em relação ao índice corpuscular, os resultados mostraram que houve um aumento desse índice nos macrófagos infectados e tratados com $16 \mu\text{g/mL}$ (757 ± 153) quando comparado ao controle macrófago infectado com *Leishmania* (525 ± 105) (Anova seguido por Student Newman-Keuls, $p < 0,05$). Em relação ao controle macrófago ($16,5 \pm 15$), foi observado um aumento desse índice para o controle LPS (413 ± 74), para o controle macrófago infectado com *Leishmania* (525 ± 105), e para os macrófagos infectados e tratados com $0,25 \mu\text{g/mL}$ (640 ± 61), $1 \mu\text{g/mL}$ ($578 \pm 69,5$), 4

$\mu\text{g/mL}$ ($544 \pm 46,5$), $16 \mu\text{g/mL}$ (757 ± 153) e $64 \mu\text{g/mL}$ (545 ± 120) (Anova seguido por Student Newman-Keuls, $p < 0,05$) (Figura 19C). A figura 20 mostra a fotomicrografia de macrófagos peritoneais infectados ou não com formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com diferentes concentrações da piplartina (1) e da cinamida 5, corados com óleo vermelho, para demonstrar a presença ou não de corpúsculos lipídicos.

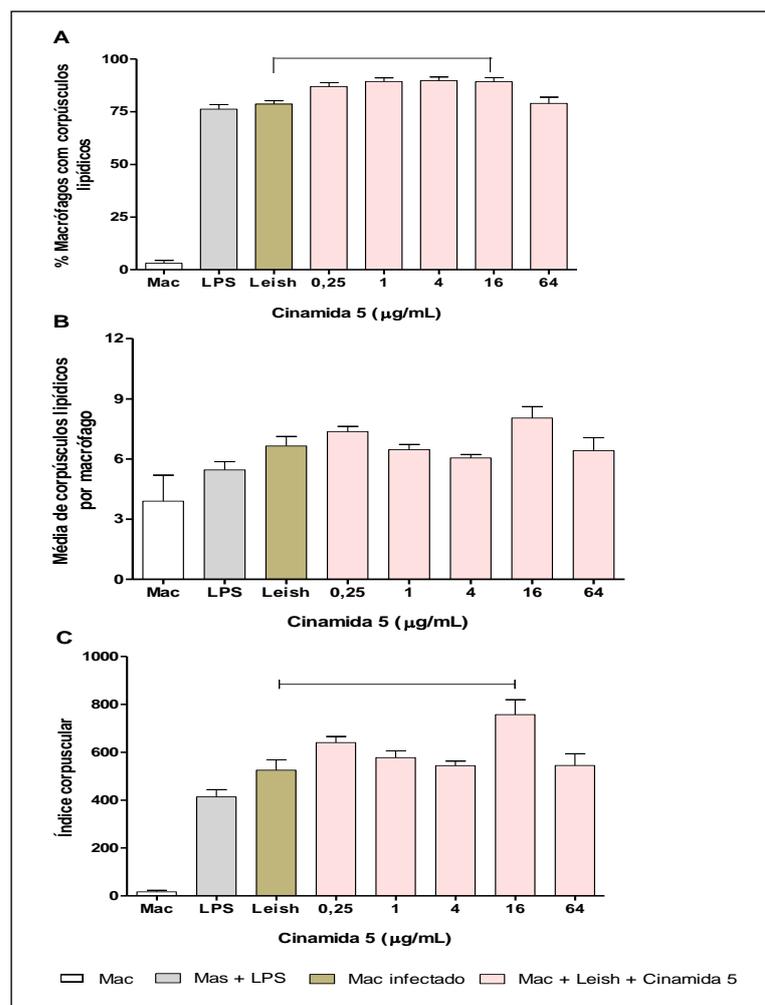


Figura 19. Efeito da cinamida 5 na formação de corpúsculos lipídicos em cultivos de macrófagos peritoneais de camundongos swiss ($n=6$) infectados ou não com *L. amazonensis*. Em A, % de macrófagos com corpúsculos lipídicos, em B média de corpúsculos lipídicos por macrófagos, em C, índice corpuscular. (—) valores considerados significativos quando comparados com o controle macrófago infectado com leishmânia (Mac leish) (Anova seguido por Student Newman-Keuls, $p < 0,05$). Os dados estão representados em média e desvio padrão.

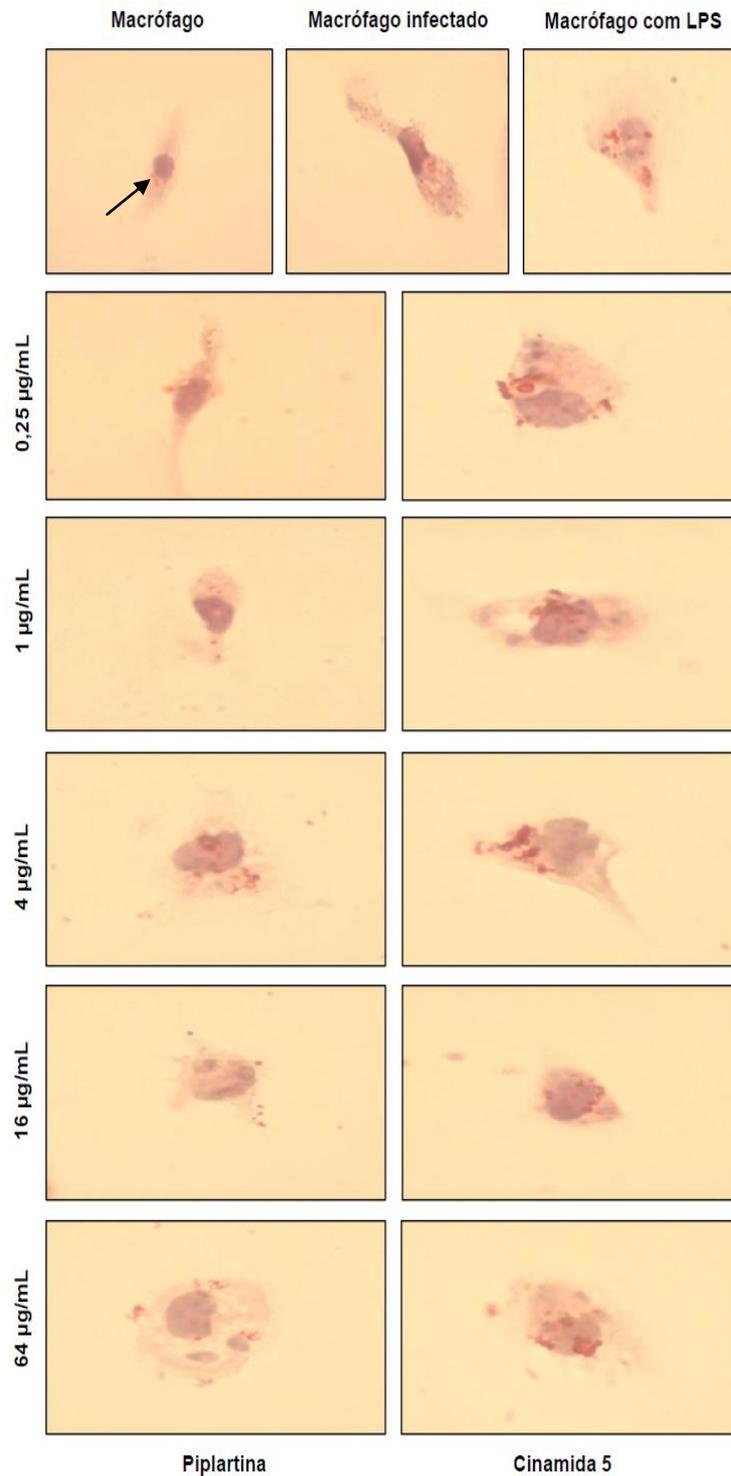


Figura 20. Fotomicrografia de macrófagos peritoneais de camundongos swiss infectados ou não com formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com diferentes concentrações da piplartina e da cinamida 5, corados com óleo vermelho para demonstrar a presença ou não de corpúsculos lipídicos. Aumento 100x. A seta aponta para os corpúsculos lipídicos.

4.15. Sumário dos Resultados

Para facilitar a visualização dos dados, as tabelas 9 e 10 sintetizam os resultados microbicidas, citotóxicos e imunomoduladores em comparação ao grupo controle.

Tabela 9. Efeito microbicida em *P. falciparum* e *L. amazonensis*, e citotóxico em células peritoneais.

Parâmetros avaliados	Efeito microbicida e citotóxico da pipartina (1) e cinamidas 2 - 5 em <i>P. falciparum</i> e <i>L. amazonensis</i> , e em células peritoneais				
	IC ₅₀ , CC ₅₀ µg/mL – resultados selecionados nos grupos avaliados				
	Piplartina (1)	2	3	4	5
<i>P. falciparum</i> IC ₅₀ - 48 h	6,2	100	92,9	24,4	28,2
<i>P. falciparum</i> IC ₅₀ - 72 h	↓3,2	39	173	41,4	↓6,6
<i>L. amazonensis</i> Promast (IC ₅₀ - MTT)	↓179	338	594	434	↓106
<i>L. amazonensis</i> Amast (IC ₅₀ - MTT)	333	-	-	-	612
(IC ₅₀ - Nigrosina)	210	-	-	-	711
Células peritoneais (CC ₅₀ - MTT)	232	267	274	445	254
Células peritoneais (CC ₅₀ - Nigrosina)	94	-	-	-	151
Macrófagos infectados					
% Mac Infect	↓	-	-	-	↓
Média Leis/Mac	↓	-	-	-	↓
Índice de Infecção	↓	-	-	-	↓ com 64 µg/mL ↑ com 4 µg/mL

Tabela 10. Efeito imunomodulador da piplartina (1) e cinamida 5 sobre a adesão celular, sobre a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, sobre a produção de corpúsculos lipídicos e sobre a indução de morte por apoptose inicial e/ou apoptose tardia/necrose das células peritoneais infectadas ou não com *L. amazonensis*

Parâmetros avaliados	Efeito Imunomodulador Aumento ou redução nos parâmetros avaliados	
	Piplartina (1)	Cinamida 5
Adesão das células peritoneais tratadas	↓	↓
Adesão dos macrófagos peritoneais infectados e tratados	↓	↓
Produção de peróxido de hidrogênio	↓ com 4 µg/mL	Não interferiu
Produção de óxido nítrico	↑ com 16 µg/mL	↑ com 0,25 µg/mL
Produção de corpúsculos lipídicos	↓ com 64 µg/mL	↑ com 0,25; 1; 4 e 16 µg/mL
Indução de morte celular por apoptose inicial e/ou apoptose tardia/necrose	Não interferiu	↓ percentual de células vivas ↑ das células em apoptose tardia/necrose nas células aderidas

5. DISCUSSÃO

5.1. Considerações sobre o efeito anti-protozoa e o índice de seletividade

Considerando os ensaios com eritrócitos infectados com *P. falciparum*, os resultados mostraram que depois de 48 h, a amida piplartina (1) apresentou melhor atividade inibitória seguida das N-pentilcinamidas secundárias (4) e (5), enquanto os derivados morfolina (2) e (3) tiveram perfil similar. Estes resultados apontam para a característica molecular desses compostos, onde a fração hidrofóbica combinada com o grupo hidrofílico (4 e 5) promove uma melhor resposta na inibição do crescimento do parasito.

Os resultados da incubação de 72 h mostraram que a piplartina (1) foi o melhor composto seguido da N-pentilcinamida secundária (5), enquanto o morfolino DM foi o composto menos efetivo (3), e os dois derivados TM, morfolino (2) e a N-pentilcinamida secundária (4), mostraram similar atividade inibitória. Os resultados também mostraram inibição do crescimento do parasito num padrão dose dependente para os compostos estudados, à semelhança do potencial plasmodicida verificado para outros compostos derivados de ácidos benzóicos das plantas do gênero *Piper* (Rahman et al., 1999; Flores et al., 2009). No nosso estudo, a piplartina (1) foi mais efetiva contra *P. falciparum* do que os compostos (2 - 5), exibindo o menor IC₅₀ depois de 72 h de incubação, o que aliado ao baixo potencial citotóxico obtido para células peritoneais, resultou numa seletividade 72,5 vezes maior para o plasmódio do que para as células peritoneais (ver tabela 6).

Estudos *in vitro* demonstraram que o *P. falciparum* possui um complexo protéico chamado de proteassoma - ubiquitina (UPS), e que este complexo atua em vias celulares pela degradação de proteínas no citosol e também na proliferação celular, apoptose e na apresentação antigênica. Tem sido descrito na literatura uma substância chamada lactacistina que é capaz de inibir essa atividade do proteassoma (Glickman e Ciechanover, 2002). Muñoz et al. (2015) mostraram que esta substância atuou sobre as formas exoeritrocitárias do *P. berghei* e ocasionou uma inibição do

desenvolvimento dessas formas, apesar de não impedir a invasão dos esporozoítos nas células do hospedeiro. O efeito inibitório da lactacistina é estágio-específica, e embora nenhum camundongo infectado tenha sobrevivido, houve redução da parasitemia desses animais infectados. Além disso, a lactacistina também inibiu o crescimento de *P. falciparum in vitro*. Acreditamos que a piplartina (1) e as cinamidas (2 - 5) possam ter sido capazes de inibir a atividade proteassômica do *P. falciparum*, e conseqüentemente, ocasionando a morte desse parasito. Por outro lado, possivelmente essas amidas tenham atuado nos mecanismos de sobrevivência do *P. falciparum* nos eritrócitos. Sabe-se que essa sobrevivência é possível graças à capacidade dos parasitos polimerizarem, via plasmepsinas e falcipainas, o radical heme gerado a partir da digestão enzimática da hemoglobina dentro de vacúolos parasitóforos, em hemozoína (Olliaro e Goldberg, 1995), impedindo assim a toxicidade mediada por espécies reativas de oxigênio (Ginsburg et al., 1999; Sullivan, 2002). Em sendo assim, é possível que os compostos avaliados nesse estudo possam ter interferido na atividade enzimática relacionada à digestão da hemoglobina pelo *P. falciparum*, impedindo a disponibilização de nutrientes ou mesmo impedindo a polimerização do radical heme e, conseqüentemente, sua exposição à toxicidade, uma vez que este radical é bastante reativo. Este outro aspecto pode ter favorecido a maior toxicidade das amidas para o *Plasmodium*.

Nossos resultados indicam a potencialidade da piplartina (1) no tratamento da malária, que, inclusive pelos efeitos inibitórios na produção de espécies reativas de oxigênio e nas vias celulares relacionadas à produção de citocinas, JNK e NF- κ B (Xiao et al., 2016), pode minimizar os efeitos da imunopatogenia observada na malária grave (Muniz-Junqueira, 2007).

Além dos ensaios envolvendo o *P. falciparum* também avaliamos o efeito das amidas sobre os cultivos de *L. amazonensis*. Nosso estudo mostrou que a piplartina (1) e as quatro cinamidas 2, 3, 4 e 5 foram capazes de reduzir o crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis* num padrão dose dependente, sendo que a menor IC₅₀ foi obtida para o composto 5 (106 μ g/mL) e a maior para o composto 3 (594 μ g/mL). Acredita-

se que a substituição bioisostérica do grupo metileno no anel piperidina (**1**) por um átomo de oxigênio no derivado morfolino (**2**) tenha diminuído o perfil de atividade, sugerindo interações hidrofílicas relevantes. Por sua vez a simplificação molecular do grupo 3,4,5-trimetoxicinamoil (TM) (**2**) pelo grupo 3,4-dimetoxicinamoil (DM) diminuiu a atividade do composto (**3**).

A abertura do anel de piperidina, resultando nas cinamidas **4** e **5**, foi explorada para comparar a contribuição de subunidades hidrofóbicas cíclicas e acíclicas, e ao contrário dos resultados observados para os derivados **1**, **2**, **3** e **4**, o 3,4-dimetoxicinamida (**5**) mostrou uma melhor atividade em relação a todos os compostos avaliados. Esse resultado indica que a subunidade dimetóxi interage mais significativamente do que a subunidade trimetóxi. Além disso, a presença do grupo N-pentil livre confere um perfil de subunidade hidrofóbica e hidrofílica, o que pode ter favorecido a melhor atividade desse composto.

Embora o mecanismo de ação da piplartina (**1**) não esteja esclarecido, tem sido descrito em outros estudos que esse composto é capaz de inibir processos proliferativos e ativar eventos apoptóticos em células cancerígenas (Bodiwala et al., 2007; Cotinguiba et al., 2009; Bezerra et al., 2013), possivelmente por causar danos ao DNA via inibição da atividade enzimática da topoisomerase II (Bezerra et al., 2013). Outro mecanismo de morte celular está relacionado a diminuição do metabolismo e da produção de espécies reativas de oxigênio em células normais (Xiao et al., 2016).

Outro aspecto relacionado aos possíveis efeitos da piplartina (**1**) e cinamidas refere-se à regulação de processos celulares básicos mediados pelo sistema UPS (Glickman & Ciechanover, 2002; Muñoz et al. 2015). Os achados de Silva-Jardim et al. (2004) mostraram redução no crescimento de *L. chagasi* em cultivos tratados com lactacistina pelo bloqueio da atividade proteossômica e mais recentemente, os achados de Jarvius et al. (2013), mostraram que a piplartina (**1**) foi capaz de inibir o sistema UPS e induzir a produção de espécies reativas de oxigênio por células tumorais.

Considerando esses estudos é possível supor que o efeito microbicida da piplartina (**1**) e seus derivados, nos cultivos de *L. amazonensis*, pode ser resultado da inibição do sistema UPS com reflexos na redução do metabolismo celular e ativação de vias apoptóticas.

Os protozoários *Leishmania* sp. e *Plasmodium* sp. são agentes infecciosos intracelulares. O sistema imunológico humano tem a função de construir uma defesa contra esses parasitos (Coelho - Castelo et al., 2009). A primeira linha de defesa do organismo é feita através da imunidade inata, sendo representada por barreiras físicas, químicas e biológicas, por células especializadas e por componentes solúveis. As principais células efetoras são os macrófagos, neutrófilos, células dendríticas e células NK (Cruvinel et al., 2010). Os macrófagos, por exemplo, fagocitam e produzem espécies reativas de oxigênio e nitrogênio na tentativa de eliminar esses agentes patogênicos (Gomes et al., 2011). Tendo em vista que essas células efetoras apresentam grande importância nas defesas do hospedeiro, avaliamos aqui o efeito tóxico das amidas **1**, **2**, **3**, **4** e **5** sobre as mesmas.

Para determinar a concentração tóxica foram utilizadas células peritoneais de camundongos swiss (modelo animal escolhido para este estudo), avaliadas por dois métodos distintos: ensaio utilizando o sal MTT e ensaio utilizando o corante nigrosina. Sendo assim, trabalhamos com duas metodologias para determinação da concentração tóxica para 50 % das células peritoneais (CC₅₀). O ensaio utilizando o MTT apresenta vantagem por ser feito com o aparelho espectrofotômetro, que por sua vez, ler uma grande quantidade de amostras com alto grau de precisão (Mosmann, 1983). Por outro lado, meios de cultura com pH não adequado e a exposição prolongada do MTT à luz podem causar uma redução espontânea deste sal com aumento da produção dos cristais de formazan resultando em valores de absorbâncias aumentados (Riss et al., 2013). Para o ensaio utilizando a coloração por nigrosina, a leitura dos resultados é realizada por microscopia óptica com contagem manual em câmara de Neubauer consumindo muito tempo do pesquisador e limitando a quantidade de amostras a serem lidas de uma única vez (Coelho, 2008; Souza et al., 2015). Mesmo assim, pode

ser considerada uma técnica simples e de baixo-custo (Gonçalves et al., 2014).

A CC_{50} para as células tratadas com as amidas **1**, **2**, **3**, **4** e **5** foi de 232, 267, 274, 445 e 254 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (método MTT). Já, quando avaliadas pela coloração com nigrosina, foi de 94 e 151 $\mu\text{g/mL}$, para **1** e **5** respectivamente. De acordo com Bezerra et al. (2013), a piplartina (**1**) quando testada a 200 $\mu\text{g/mL}$ não apresenta atividade hemolítica, e diante disso, sugerem que sua toxicidade não está relacionada a dano de membrana. Bezerra et al. (2008), avaliaram o efeito da piplartina (**1**) em derivados de fibroblatos pulmonares de hamsters e perceberam uma interrupção do ciclo celular seguido da apoptose mitocondrial, conforme observado pela condensação da cromatina, fragmentação do DNA e perda do potencial da membrana mitocondrial. Outros estudos precisam ser realizados para entender o mecanismo de ação da piplartina e de seus derivados na toxicidade celular.

Os resultados obtidos nesse ensaio com células de mamíferos foram fundamentais para determinarmos as concentrações seguras da piplartina (**1**) e de seus derivados **2**, **3**, **4** e **5** a serem testadas em estudos posteriores envolvendo os macrófagos e também para calcularmos o IS para essas amidas. Na busca por compostos que sejam ativos contra micro-organismos patogênicos é importante levar em consideração que os mesmos não devam ser tóxicos para as células do hospedeiro. Para isso, é calculado o IS (CC_{50}/IC_{50}) que deve ter resultado superior a 10 para que seja considerado seguro (Nakamura et al., 2006). Como mostrado na tabela 6, os melhores índices foram para as amidas **1**, **4** e **5** nos ensaios envolvendo *P. falciparum*, e para **1** e **5** nos ensaios envolvendo *L. amazonensis*. Apesar dos resultados terem sido melhores para o *P. falciparum* ($IS > 10$), optou-se por continuar os estudos com o protozoário leishmânia ($IS < 10$), para avaliar o efeito imunomodulador das amidas **1** e **5** sobre os macrófagos infectados com *L. amazonensis*, uma vez que os macrófagos são as células - alvo desse agente infeccioso (Kedzieski e Evans, 2014).

5.2. Considerações sobre a funcionalidade dos macrófagos na presença ou ausência da infecção

A. Efeito microbicida

O cultivo de amastigotas axênicas *in vitro* tem relevante importância nos testes de novas drogas para o tratamento da leishmaniose (Callahan et al., 1997). Através da curva de crescimento desse parasito é possível verificar em quais fases este se encontra (Lag, Log ou exponencial, estacionária e Declínio) no sistema de cultivo, tendo em vista que muitos autores associam a fase de crescimento ao sucesso da infectividade (Silva, 2008). Através da curva de crescimento realizada em nosso estudo foi possível identificar a fase ideal para infecção dos macrófagos (especificamente no dia 6), sendo esta o final da fase log de crescimento (Figura 4). O padrão de crescimento observado aqui coincide ao que é descrito por Rogério (2017).

No que se refere ao efeito da piplartina (**1**) sobre os macrófagos infectados com amastigotas axênicas de *L. amazonensis*, observou-se uma diminuição do índice de infecção em 41,3 % após o tratamento com 64 µg/mL. Da mesma forma, a cinamida **5** diminuiu o índice de infecção em 33 % com 64 µg/mL. Dias (2014) mostrou que o Glucantime, droga de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses, é capaz de diminuir o índice de infecção em 55 %, na concentração de 300 µg/mL, dos macrófagos infectados com *L. amazonensis*. O resultado obtido para as amidas **1** e **5** se mostraram superiores quando comparados ao glucantime.

Possivelmente, a piplartina (**1**) e a cinamida **5** interagiram, por mecanismos desconhecidos, com as membranas celulares dos macrófagos e, subsequentemente com a membrana do parasito. Além da inibição do sistema UPS descrito anteriormente, especula-se que essas amidas tenham atuado na inibição da adenosina (ATP) e guanosina trifosfato (GTP) (Berman, 1988) por meio do bloqueio da atividade glicolítica e oxidativa de ácidos graxos de amastigotas, da forma que estas diminuem a capacidade

de fosforilação de ADP a ATP levando a diminuição de ATP intracelular, e conseqüentemente, ocasionando a morte do parasito (Koff e Rosen, 1994). Com relação ao aumento no índice de infecção com 4 µg/mL da cinamida **5**, pode ter ocorrido um fenômeno conhecido como hormese. Na hormese, baixas concentrações de uma substância, que é potencialmente tóxica em altas concentrações, são capazes de ocasionar estímulo (Rattan, 2004).

Foi avaliado também o efeito das amidas **1** e **5** sobre os cultivos de amastigotas axênicas. Os resultados mostraram que a incubação com diferentes concentrações dessas amidas causou uma diminuição da viabilidade desses cultivos. Quando avaliado pelo método MTT, observou-se um IC₅₀ de 333 µg/mL para **1** e 612 µg/mL para **5**. Entretanto, para a viabilidade das amastigotas avaliada com nigrosina, observou-se um IC₅₀ de 210 µg/mL para **1** e 711 µg/mL para **5**.

Quando comparamos a ação das amidas em macrófagos infectados com amastigotas axênicas e em cultivos amastigotas axênicas, notamos que os resultados foram melhores quando os macrófagos foram infectados e tratados. Isso pode ser explicado pelo fato de quando os macrófagos estão ativados, eles produzem espécies reativas por meio de seu sistema enzimático em resposta a infecção (Elomaa et al., 1998).

B. Expressão de receptores para a aderência celular e indução de morte celular

Avaliamos nesse estudo o percentual de células aderidas sobre as lamínulas depois de tratadas com diferentes concentrações da piplartina (**1**) e da cinamida **5** e ainda quando estas células foram infectadas depois tratadas. Houve diminuição da adesão celular nos dois ensaios, sendo que esta diminuição foi maior nos macrófagos que haviam sido infectados e tratados.

Diante disso, sugere-se duas hipóteses para facilitar a compreensão desse resultado obtido. Pode estar ocorrendo 1) um tipo de morte celular conhecida como apoptose, pois as características que a definem incluem

retração celular com conseqüente perda de aderência (Grivicich et al., 2007). Além disso, sabe-se que a citocina inflamatória TNF - α tem função de estimular a expressão de moléculas de adesão em leucócitos (Teixeira et al., 2014), e nesse sentido, sua diminuição pode resultar numa conseqüente redução dessas moléculas. Diante do exposto acima, avaliamos se os macrófagos infectados e tratados estariam morrendo por apoptose ou por necrose utilizando a marcação com Anexina V- FITC e Iodeto de propídio.

As diferentes concentrações da piplartina (**1**) não diminuíram o percentual de células vivas que estavam soltas no sobrenadante dos cultivos. Também não induziram a morte celular por apoptose ou necrose. A análise das células do sobrenadante das escavações foi realizada porque quando os macrófagos foram infectados e tratados com a piplartina (**1**) ocorreu redução da adesão celular em todas as concentrações avaliadas, e estas células por sua vez, ficaram soltas das lamínulas. Com isso, havíamos sugerido que essas células desprendidas estariam sofrendo apoptose. Mas, diante dos resultados elencados acima, o percentual de células vivas que estavam no sobrenadante foi cerca de 77 %, contrariando nossa sugestão. De forma semelhante, não houve diminuição do percentual de células vivas nem indução de apoptose ou necrose nos cultivos aderidos.

Diferente dos resultados encontrados em nosso trabalho, Machado (2016) mostrou que a piplartina (**1**) foi capaz de induzir a morte celular por apoptose em células de carcinoma colorretal, depois da incubação de 24 h. Esse resultado a torna promissora para o tratamento dessa doença, uma vez que nesse tipo de morte celular não ocorre resposta inflamatória local, diferentemente da necrose. Da mesma forma, Bezerra (2008) avaliou o efeito da piplartina (**1**) em linhagens leucêmicas e mostrou que essa amida foi capaz de induzir a morte celular por apoptose a partir de 12 h de incubação.

Também avaliamos o efeito da cinamida **5** sobre os macrófagos infectados. Não ocorreu diminuição do percentual de células vivas que estavam soltas no sobrenadante desses cultivos nem indução de morte celular por apoptose ou necrose. A análise das células do sobrenadante foi

feita seguindo o mesmo princípio do ensaio utilizando a piplartina (1), levando em consideração o ensaio de aderência celular. Da mesma forma, diante do percentual de 85,6 % de células vivas, a hipótese levantada de que estas células estariam se despreendendo por estarem sofrendo apoptose não é válida. Em contrapartida, para as células que estavam aderidas, nesse mesmo ensaio, os resultados mostraram uma diminuição do percentual de células vivas, uma tendência a ocorrer aumento de células em apoptose inicial e um aumento no percentual de células em apoptose tardia/necrose. Especificamente para a piplartina (1) foi observado que houve uma diminuição da viabilidade nos cultivos aderidos, quando comparada ao seu respectivo sobrenadante, principalmente em relação ao controle macrófago não infectado e não tratado (basal). Pode ter ocorrido algum estresse no momento da coleta dessas células que estavam aderidas a placa, e ter ocasionado esse resultado.

De acordo com Proskuryakov et al. (2003), a morte celular por necrose não é desejável para o parasita intracelular, uma vez que uma resposta inflamatória é gerada ativando mecanismos microbicidas pelo hospedeiro e ocasionando a morte do parasito. Nesse sentido, a intensidade dessa resposta inflamatória para o hospedeiro deverá ser avaliada em estudos posteriores.

Como demonstrado acima, quase 100 % das células do sobrenadante (células que se desprenderam das lamínulas) estavam vivas. Logo, possivelmente essas amidas estejam atuando nas vias de produção da citocina inflamatória TNF - α . Sendo assim, a sua diminuição ocasionaria numa redução da expressão de moléculas de adesão pelos leucócitos (Júnior, 2008). Xiao et al. (2016) mostraram que a piplartina (1) inibiu a produção de TNF - α em células dendríticas derivadas da medula óssea e também inibiu vias celulares responsáveis pela produção de citocinas como a JNK e a NF - κ B, por exemplo. Novos ensaios serão necessários para quantificar as citocinas que estão sendo produzidas por esses macrófagos infectados e tratados com as amidas 1 e 5 para melhor esclarecimento desses resultados.

C. Produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio

Nosso trabalho avaliou a produção de espécies reativas de oxigênio (H_2O_2) e nitrogênio (NO) por macrófagos infectados. Os macrófagos são células importantes do sistema imunológico, pois desempenham funções tanto na imunidade inata como na adaptativa. Essas funções incluem fagocitose de partículas estranhas, produção de citocinas e de mediadores químicos como H_2O_2 e NO, por exemplo (Elomaa et al., 1998).

Quando os macrófagos foram infectados e tratados com diferentes concentrações da piplartina (1) houve uma diminuição da produção de peróxido de hidrogênio em relação à produção do controle basal na concentração de 4 $\mu\text{g/mL}$ e uma tendência a inibir a produção com 16 $\mu\text{g/mL}$. Em contrapartida, as diferentes concentrações da cinamida 5 testadas não interferiram positiva ou negativamente nesse processo quando comparado ao controle basal.

A geração de H_2O_2 é um processo natural na resposta imune, mas diante de uma infecção, a célula passa a consumir mais oxigênio, ocorre um aumento da oxidação da glicose, via hexose monofosfato, com produção de NADPH (Janeway, 1999). A NADPH (adenina-difosfato-nicotinamida) oxidase atua como doadora de elétron, promovendo a redução de O_2 a O_2^- , e este por dismutação espontânea ou através da enzima superóxido dismutase (SOD) é transformado em H_2O_2 (Janeway, 1999; Pick, 1980). Supõe-se que a piplartina (1) possa ter interferido na via hexose monofosfato, de forma a inibir a produção de H_2O_2 , nas concentrações 4 e 16 $\mu\text{g/mL}$, nos macrófagos infectados. Sabe-se que durante a destruição de um agente patogênico, os macrófagos podem produzir radicais livres em excesso e, dessa forma, causarem danos aos tecidos vizinhos (Pereira, 1996). Nesse sentido, essa redução da produção de H_2O_2 em baixas concentrações pode ser boa diante das infecções por *L. amazonensis*.

A influência da piplartina (1) na produção de NO por macrófagos peritoneais também foi analisada e os resultados mostraram que quando os cultivos foram infectados e tratados com a concentração de 16 $\mu\text{g/mL}$ ocorria

um aumento na produção de NO. Semelhantemente a cinamida **5**, na menor concentração (0,25 µg/mL), foi capaz de aumentar a produção de NO.

O NO é um radical livre, gasoso e instável sintetizado a partir da oxidação do átomo de nitrogênio da L - arginina por ação da enzima óxido nítrico sintase induzida (iNOS) nos macrófagos (Queiroz e Batista, 1999). As citocinas do perfil Ta1, como IFN - γ e TNF - α , induzem a formação de iNOS. Sabe-se que o NO é efetivo contra vários micro - organismos, incluindo *Trypanosoma cruzi*, *Toxoplasma gondii* e Leishmânia (Gazzinelli et al., 1992; Adams et al., 1990; Green et al., 1990; Liew et al., 1990). Estudos revelam que macrófagos peritoneais de camundongos estimulados *in vitro* com IFN - γ na presença do Lipopolissacarídeo (LPS) liberam NO em quantidades significativas capaz de destruir o parasito de forma eficiente (Liew et al., 1990). Wei et al. (1995) correlacionam a produção de NO com o controle da infecção por leishmaniose. Os resultados do nosso estudo indicam aumento da produção de NO por macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis* e tratados tanto com a piplartina (**1**) e com a cinamida **5**, indicando que essas amidas possam melhorar a ação da enzima iNOS possivelmente pelo aumento das citocinas inflamatórias.

D. Formação de corpúsculos lipídicos

Corroborando com os dados desse estudo, Bozza et al. (2009) mencionam que a concentração dos corpúsculos lipídicos em macrófagos em repouso é baixa em comparação a macrófagos que estão associados a condições infecciosas. Há relatos na literatura mostrando que ocorre um aumento na formação dessas organelas em macrófagos peritoneais de camundongos infectados com *L. amazonensis*, bem como com outras espécies de *Leishmania* sp. que causam a leishmaniose cutânea (Melo e Dvorak, 2012; Rodríguez et al., 2017). Sabe-se que a interação da *Leishmania* com os corpúsculos lipídicos serve para diferentes propósitos. Essas organelas podem fornecer lipídios para a biogênese das membranas de novos parasitas, podem servir como fonte de nutrientes e podem modular

o sistema imunológico através da produção de eicosanóides, uma vez que elas são sítios geradores desses mediadores inflamatórios (Rabhi et al., 2016; Toledo et al., 2016; Rodríguez et al., 2017). A função dessas organelas na infecção também depende da interação do parasito com o hospedeiro (Toledo et al., 2016).

Como reportado nos resultados do presente estudo, para os macrófagos que foram infectados e tratados com a piplartina (**1**) na maior concentração (64 µg/mL), houve uma redução em cerca de 60 % no percentual dessas células com corpúsculos lipídicos e também redução no mesmo percentual no índice corpuscular. A piplartina (**1**) foi capaz de modular a resposta imune inibindo a formação dessas organelas lipídicas, e teoricamente essa inibição poderá interferir na disponibilização de nutrientes para estes parasitas e/ou na disponibilização de lipídios para a biogênese das membranas de novos parasitas.

Semelhantemente, quando os macrófagos foram infectados e tratados com a cinamida **5**, houve um aumento no percentual de macrófagos com corpúsculos lipídicos em quase todas as concentrações testadas. Esse aumento pode ser favorável ao parasito, pois a célula terá mais nutriente para ele e mais lipídios para sua biogênese. No entanto, vale lembrar que, como mencionado acima, essas organelas lipídicas são fontes de mediadores inflamatórios, e que estes podem atuar modulando a resposta imune produzindo leucotrienos, limitando o crescimento do parasito, ou produzindo prostaglandinas, favorecendo este crescimento. Essa modulação irá depender da interação do parasito com o hospedeiro (Toledo et al., 2016).

6. CONCLUSÃO

Os resultados obtidos neste estudo nos permitiram elencar as seguintes conclusões:

- A piplartina (1) e as cinamidas (2 - 5) reduziram o crescimento das formas promastigotas de *L. amazonensis*.
- Cultivos de eritrócitos infectados com *P. falciparum* mostraram que a incubação por 48 h ou 72 h com a piplartina (1) foi capaz de inibir 100 % do crescimento dos parasitos com 64 ou 8 µg/mL, respectivamente.
- A dose tóxica (CC₅₀) das amidas (1 a 5) para as células peritoneais de camundongos Swiss, pelo ensaio MTT, foi de 232 µg/mL, 267 µg/mL, 274 µg/mL, 445 µg/mL e 254 µg/mL, respectivamente.
- A dose tóxica (CC₅₀) das amidas (1 e 5) para as células peritoneais, pela coloração com nigrosina, foram de 94 µg/mL e 151 µg/mL, respectivamente.
- Os índices de seletividade para as formas promastigotas de *L. amazonensis* foram inferiores a 10 para as amidas 1 a 5.
- Os índices de seletividade para cultivos de *P. falciparum* foram superiores a 10 para as amidas 1, 4 e 5.
- A piplartina (1) e a cinamida 5 reduziram o crescimento das formas amastigotas de *L. amazonensis* quando avaliadas pelo método MTT e pela coloração com nigrosina.
- A concentração 64 µg/mL da piplartina (1) diminuiu o índice de infecção de macrófagos por *L. amazonensis*, especificamente em 41,3 %.
- A concentração 64 µg/mL da cinamida 5 reduziu o índice de infecção de macrófagos infectados por *L. amazonensis*, especificamente em 33,1 %. Foi observado um aumento do índice em 12 % com 4 µg/mL.

- As diferentes concentrações da piplartina (1) e da cinamida 5 reduziram a adesão dos macrófagos infectados com *L. amazonensis*.
- As diferentes concentrações da piplartina (1) e da cinamida 5 reduziram a adesão das células peritoneais de camundongos sem infecção.
- As diferentes concentrações da piplartina (1) não induziram a morte celular dos macrófagos peritoneais por apoptose nem por necrose.
- As diferentes concentrações da cinamida 5 causaram uma diminuição da viabilidade celular dos macrófagos peritoneais que estavam aderidos sobre as lamínulas. Além disso, observou-se um aumento de morte celular por apoptose tardia/necrose e também uma tendência a ocorrer apoptose inicial nesses cultivos aderidos.
- Para os cultivos infectados e tratados com 4 µg/mL e com 16 µg/mL da piplartina (1) ocorreu uma redução da produção de H₂O₂ em relação ao controle não tratado.
- Para os cultivos infectados e tratados com a cinamida 5 não houve diferença na produção de H₂O₂ em relação ao controle não tratado.
- Para os cultivos infectados e tratados com 16 µg/mL da piplartina (1) ocorreu um aumento na produção de NO em relação ao controle não tratado.
- Para os cultivos infectados e tratados com 0,25 µg/mL da cinamida 5 ocorreu um aumento na produção de NO em relação ao controle não tratado.
- Os resultados mostraram que houve uma diminuição do índice corpuscular nos macrófagos infectados e tratados com 64 µg/mL da piplartina (1) e um aumento quando tratados com 0,25 µg/mL, comparados ao controle macrófago infectado com *Leishmania*.

- Os resultados mostraram que houve um aumento do índice corpuscular nos macrófagos que foram infectados e tratados com 16 µg/mL da cinamida 5, quando comparado o controle macrófago infectado com *Leishmania*.

Apesar dos resultados inibitórios não terem sido muito satisfatórios para a *L. amazonensis* (IS<10), tanto a piplartina (1) como a cinamida 5 em diferentes concentrações testadas foram capazes de modular a resposta imune, atuando na diminuição da expressão dos receptores celulares, na diminuição e/ou no aumento de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio e na diminuição e/ou no aumento dos corpúsculos lipídicos nos macrófagos infectados. No ensaio que avaliou a indução de morte celular, somente nos cultivos tratados com a cinamida 5 e infectados com *L. amazonensis*, ocorreu diminuição do percentual de células vivas que estavam aderidas sobre a placa, aumento da morte celular por apoptose tardia/necrose e tendência a aumento da morte celular por apoptose inicial.

Os resultados do nosso estudo também indicam a potencialidade da piplartina (1) e da cinamida 5 para o tratamento da malária, uma vez que obtivemos inibição total do parasito em concentrações baixas e elevados índices de seletividade para esses compostos, o que demonstra a segurança para a utilização dos mesmos.

7. LIMITAÇÕES E PERSPECTIVAS

A piplartina (**1**) e a cinamida **5** diminuíram a infecção por *L. amazonensis* nos macrófagos, mas em contrapartida, essas amidas foram capazes de diminuir a aderência dessas células das lamínulas, o que pode ser considerado uma limitação do nosso estudo, uma vez que parte das células foi liberada na suspensão. Uma nova metodologia deverá ser adotada para que seja possível avaliar o efeito microbicida nessas células que não aderiram.

As amidas **1** e **5** também interferiram na produção de espécies reativas de oxigênio, nitrogênio e de corpúsculos lipídicos nos macrófagos infectados, indicando que as mesmas atuaram como moduladoras da resposta imune na leishmaniose. O aumento da produção de NO, observado nas baixas concentrações, pode auxiliar na diminuição da infecção. Especificamente, em relação à produção de H₂O₂, houve uma inibição na produção pelos macrófagos infectados e tratados com baixas concentrações de **1** quando comparados ao controle basal. Diante disso, estudos *in vivo* devem ser realizados para avaliar como o aumento ou diminuição desses radicais podem atuar no decorrer da infecção. Além disso, novos ensaios serão necessários para quantificar as citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias produzidas pelos macrófagos infectados com *L. amazonensis*.

Em relação aos corpúsculos lipídicos, como estes são sítios para geração de mediadores inflamatórios, e por sua vez, são capazes de modular a resposta imune, são necessários novos testes para quantificar quais mediadores estão sendo produzidos, se leucotrienos ou prostaglandinas, afim de melhor compreendermos a infecção diante do tratamento com essas amidas.

Outro aspecto que precisa ser analisado se refere ao mecanismo de morte em macrófagos sem infecção, se há uma diminuição das células vivas quando tratadas com as amidas em questão ou se há um aumento ou uma diminuição da morte celular por apoptose inicial ou apoptose tardia/necrose nessas células. Além disso, faz - se necessário aumentar os tempos de incubação dos tratamentos e avaliar se há diferenças em relação aos tempos já utilizados.

Foi observado no ensaio de indução de morte celular dos macrófagos infectados, que nos cultivos aderidos tratados ou não com a pipartina (1), o percentual de células vivas foi inferior aos dos cultivos avaliados no sobrenadante. Pode ter ocorrido algum tipo de estresse nessas células durante a lavagem para soltá-las das lamínulas. Sugerimos a repetição desse ensaio aumentando o número de repetições para cada concentração, para confirmação desses resultados.

Os resultados do nosso estudo também mostraram potencial antiprozoa das amidas com baixa toxicidade para as células do hospedeiro e demonstraram que a pipartina (1) e os derivados 4 e 5 podem ser alternativas promissoras no tratamento da malária, sugerindo novos ensaios para avaliar os efeitos na malária murina e determinar os mecanismos de ação nas células do sistema imune.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pillai, S. **Imunologia Celular e Molecular**. Rio de Janeiro: editora Elsevier. 7ª ed. 2011.

Adams, D.J.; Dai, M.; Pellegrino, G.; Wagner, B.K.; Stern, A.M.; Shamji, A.F.; Schreiber, S.L. Synthesis, cellular evaluation, and mechanism of action of piperlongumine analogs. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. v.109, n. 38, 2012.

Adams, L.B.; Hibbs, J.R.; Taintor, R.R.; Krahenbuhl, J.L. Microbiostatic effect of murine activated macrophages for *Toxoplasma gondii*. Role for synthesis of inorganic nitrogen oxides from L-arginine. **The Journal of Immunology**. v. 144, 1990.

Aga, E.; Katschinski, D.M.; Zandbergen, G.V.; Laufs, H.; Hanser, B. Muller, K.; Solbach, W.; Laskay, T. Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*. **The Journal of Immunology**. v.169, 2002.

Almeida, G.F. **Leishmanioses visceral e tegumentar canina: revisão da literatura**. 2006. 63f. Pós-graduação "latu sensu". Universidade Castelo Branco. Departamento de Clínica Médica, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, 2006.

Almeida, S.L.; Santos, J.B. Avanços no tratamento da leishmaniose tegumentar do novo mundo nos últimos dez anos: uma revisão sistemática de literatura. **Anais Brasileiros de Dermatologia**. v.86, 2011.

Andade, S.G. Apoptose e sua importância no curso da infecção pelo *Trypanosoma cruzi*. **Revista de Patologia Tropical**. v.32, n.2. 2003.

Andrews, P.R.; Craik, D.J.; Martin, J.L. Functional group contributions to drug-receptor interactions. **Journal of Medicinal Chemistry**. v.27, n.12, 1984.

Anazetti, M.C.; Melo, P.S. Morte celular por apoptose: uma visão bioquímica e molecular. **Metrocamp Pesquisa**. v.1, n.1, 2007.

Aquino, D. **Avaliação do efeito microbicida da filosseptina-1 nas formas amastigotas de *Leishmania amazonensis* in vitro**. 66f. 2014. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Brasília, Medicina Tropical, Brasília, 2014.

Araújo-Santos, T.; Rodríguez, N.E.; Moura-Pontes, S.; Dixt, U.G.; Abánades, D.R.; Bozza, P.T.; Wilson, M.E.; Borges, V.M. Role of Prostaglandin F2 α production in lipid bodies from *Leishmania infantum chagasi*: insights on virulence. **The Journal of Infectious Diseases**. v.210, 2014.

Barral-Neto, M.; Barral, A. Transforming growth factor-beta in tegumentary leishmaniasis. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**. v.27, n.1, 1994.

Barral, A.; Barral-Neto, M. Aspectos imunológicos da leishmaniose cutânea difusa (LCD). **Gazeta Médica da Bahia**.v.79, n.3, 2009.

Bates, P.A. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. **International Journal for Parasitology**. v.37, 2007.

Berman, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. **Reviews of Infectious Diseases**. v.10, n.3, p.560-86,1988.

Beteck, R.M.; Smit, F.J.; Haynes, R.K.; N'da, D.D. Recent progress in the development of anti-malarial quinolones. **Malaria Journal**.v.13, 2014.

Bezerra, D.P. Estudo das propriedades anticâncer da pipartina. 2008. 274 f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal do Ceará. Departamento de Fisiologia e Farmacologia, Fortaleza, 2008.

Bezerra, D.P.; Pessoa, C.; Moraes, M.O.; Saker-Neto, N.; Silveira, E.R.; Costa-lotufo, L.V. Overview of the therapeutic potential of peplartine (piperlongumine). **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v.48, n.3, 2013.

Bezerra, D.P.; Moura, D.J.; Rosa, R.M.; De Vasconcelos, M.C.; Silva, A.C.; Moraes, M.O.; Silveira, E.R.; Lima, M.A.; Henriques, J.A.; Costa-Lotufo, L.V.; Saffi, J. Evaluation of the genotoxicity of pipartine, an alkaloid of *Piper tuberculatum*, in yeast and mammalian V79 cells. **Mutation Research**. v.652, n. 2, 2008.

Bodiwala, H.S; Singh, G.; Singh, R.; Dey, C.S.; Sharma, S.S.; Bhutani, K.K.; Singh, I.P. Antileishmanial amides and lignans from *Piper cubeba* and *Piper retrofractum*.**Nature Medicine**. v.61 n.4, 2007.

Bozza, P.T.; Magalhães, K.G.; Weller, P.F. Leukocyte lipid bodies-biogenesis and functions in inflammation. **Biochimica et Biophysica Acta**. v.1791, n.6, 2009.

Bozza, P.T.; Yu, W.; Penrose, J.F.; Morgan, E.S.; Dvorak, A.M.; Weller, P.F. Eosinophil lipid bodies: specific, inducible intracellular sites for enhanced eicosanoid formation. **The Journal of Experimental Medicine**. v.186, n.6,1997.

Burrows, J.N.; Burlot, E.; Campo, B.; Cherbuin, S.; Jeanneret, S.; Leroy, D.; Spangenberg, T.; Waterson, D.; Wells, T.NC.; Willis, P. Antimalarial drug discovery – the path towards eradication. **Parasitology**. v.141, n.1, 2014.

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

Bragança, T.; Sehnen, D.; Benamor, I.; Jesus, I.; Valentin, R.M.; Zambuzzi, W. F.; Takamori, E.R. Protocolos para avaliação de citotoxicidade. Universidade Unigranrio. Duque de Caxias, 2012.

Brombacher, F. The role of interleukin-13 in infections diseases and allergy. **BioEssays.** v.22, n.7, 2000.

Campos, M.P. **Análise do potencial antimicrobiano de extrato, frações e substâncias puras obtidas de *Piper solmsianum* C.D.C. VAR. *solmsianum* (PIPERACEAE).** 2006. 90f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) Departamento de Farmácia, Universidade do Vale do Itajaí, Itajaí, 2006.

Camargo, E.P. Malária, Maleita, Paludismo. **Ciência e Cultura.** v.55, n.1, 2003.

Caldart, E.T.; Freire, R.L.; Ferreira, F.P.; Ruffolo, B.B.; Sbeghen, M.R.; Mareze, M.; Garcia, J.L.; Mitsuka-Breganó, R.; Navarro, I.T. *Leishmania* in synanthropic rodents (*Rattus rattus*): new evidence for the urbanization of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária.** v. 26, n.1, 2017.

Callanhan, H.L.; Portal, A.C.; Devereaux, R.; Grogl, M. An axenic amastigote system for drug screening. **Antimicrobial agents and chemotherapy.** v.41. n.4, 1997.

Carlsen, E.D.; Liang, Y.; Shelite, T.R.; Walker, D.H.; Melby, P.C.; Soong, L. Permissive and protective roles for neutrophils in leishmaniasis. **Clinical and experimental Immunology.** v.182, n.2, 2015.

Carvalho, E.M.; Barral, A.; Costa, J.M.; Bittencourt, A.; Marsden, P. Clinical and immunopathological aspects of disseminated cutaneous leishmaniasis. **Acta Tropica.** v.56, 1994.

Cavalcante, I.J.M.; Vale, M.R. Aspectos epidemiológicos da leishmaniose visceral (calazar) no Ceará no período de 2007 a 2011. **Revista Brasileira de Epidemiologia.** v.17, n.4, 2014.

Conceição, J.A. **O papel dos neutrófilos na leishmaniose tegumentar causada por *Leishmania braziliensis*.** 2014. 96f. Dissertação - Programa de Pós-graduação em Imunologia, Universidade Federal da Bahia, Bahia, 2014.

Continguiba, F.; Regasini, L.O.; Bolzani, V.S.; Deboni, H.M.; Passerini, G.D.; Cicarelli, R.M.B.; Kato, M.J.; Furlan, M. Piperamides and their derivatives as potential anti-trypanosomal agents. **Medicinal Chemistry Research**. v.18, n. 9, 2009.

Coelho, J.P. **Avaliação da biocompatibilidade de magnetolipossomas à base de nanopartículas de maghemita**. 2008. 86f. Dissertação – Programa de Pós-graduação em Patologia Molecular, Universidade de Brasília, Brasília, 2008.

Coelho-Castelo, A.A.M.; Trombone, A.P.F.; Rocha, C.D.; Lorenzi, J.C.C. Resposta imune a doenças infecciosas. **Medicina**. v.42,n.2, 2009.

Coura, J.R. **Dinâmica das doenças infecciosas e parasitárias**. 2 ed. Rio de Janeiro: editora Guanabara Koogan, 2013.

Couppiè, P.; Clyti, E.; Sainte-Marie, D.; Dedet, J.P.; Carme, B.; Pradinaud, R. Disseminated cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania guyanensis*: case of a patient with 425 lesions. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**. v.71, n.5, 2004.

Cruvinel, W.M.; Júnior, D.M.; Araújo, J.A.P.; Catelan, T.T.T.; Souza, A.W.S.; Silva, N.P.; Andrade, L.E.C. Sistema Imunitário – Parte I Fundamentos da imunidade inata com ênfase nos mecanismos moleculares e celulares da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Reumatologia**. v.50, n.4, 2010.

Da Cruz. A.M.; Bittar, R.; Matos, M.; Oliveira-Neto, M.P.; Nogueira, R.; Pinho-Ribeiro, V.; Azeredo-Coutinho, R.B.; Coutinho, S.G. T- cell mediated immune responses in patients with cutaneous or mucosal Leishmaniasis: Long – term evaluation after therapy. **Clinical and Diagnostic Laboratory Immunology**. v.9, n.2, 2002.

Dias, C.N.S. **Avaliação da atividade antileishmania de produtos naturais obtidos de *Phyllanthus acuminatus* e de *Hyptis macrostachys***. 2014. 114f. Dissertação - Programa de Pós - graduação em produtos naturais e sintéticos bioativos, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2014.

Dondorp, A.M.; Ince, C.; Charunwatthana, P.; Hanson, J.; Van Kuijen, A.; Faiz, M.A.; Rahman, M.R.; Hasan, M.; Bin Yunus, E.; Ghose, A.; Ruangveerayut, R.; Limmathurotsakul, D.; Mathura, K.; White, N.J.; Day, N.P. Direct *in vivo* assessment of microcirculatory dysfunction in severe falciparum malaria. **The Journal of Infections Diseases**. v.197, n.1, 2008.

Dorval, M.E.M.C.; Oshiro, E.T.; Cupollilo, E.; Castro, A.C.C.; Alves, T.P. Ocorrência de leishmaniose tegumentar americana no Estado do Mato Grosso do Sul associada à infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.39, n.1, 2006.

Dvorak, A.M.; Weller, P.F.; Harvey, V.S.; Morgan, E.S.; Dvorak, H.F. Ultrastructural localization of prostaglandin endoperoxide synthase (cyclooxygenase) to isolated, purified fractions of guinea pig peritoneal macrophage and line 10 hepatocarcinoma cell lipid bodies. **International Archives of Allergy and Immunology**. v.101, n.2, 1993.

Elomaa, O.; Sankala, M.; Pikkarainen, T. Structure of the Human Macrophage MARCO Receptor and Characterization of Its Bacteria-binding Region. **The journal of biological chemistry**. v.273, 1998.

Emilson L.B.; Dougherty K.A.; Cockett A.T.; Urry R.L. Simultaneous determination of human sperm morphology and viability: simple office technique. *Urology*. 11:488-491, 1978.

FAPESP. Artemísia contra a malária. ed. 208, 2013. Disponível em: <http://revistapesquisa.fapesp.br/2013/06/05/artemisia-contra-malaria/>. Acessado em: 20.01.2015.

Ferreira, R.G.; Azevedo, R.C.S.; Reiners, A.A.O.; Souza, T.G.; Fontes, C.J.F. Adesão ao tratamento da malária e fatores contribuintes. **Revista Eletrônica de Enfermagem**. v.16, n.1, 2014.

Ferreira, M.G.P.R.; Kayano, A.M.; Silva-Jardim, I.; Silva, T.O.; Zuliani, J.P.; Facundo, V.A.; Calderon, L.A.; Almeida-e-Silva, A.; Ciancaglini, P.; Stábeli, R.G. Antileishmanial activity of 3-(3,4,5-trimethoxyphenyl) propanoic acid purified from Amazonian *Piper tuberculatum* Jacq., Piperaceae, fruits. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.20,n.6, 2010.

Fokoue, H.H. **Síntese, atividades biológicas e estudo de relação de estrutura-atividade de piperamidas**. 2015. 337f. Tese (Doutorado em Química) - Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo. 2015.

Fumarola, L.; Spinelli, R.; Brandonisio, O. In vitro assays for evaluations of drug activity against *Leishmania* spp. **Research Microbiology**. v.155, 2004.

Flores, N.; Jiménez, I.A.; Giménez, A.; Ruiz, G.; Gutiérrez, D.; Bourdy, G.; Bazzocchi, I.L. Benzoic Acid Derivatives from Piper species and their antiparasitic activity. **Phytochemistry**. v.70, 2009.

Gasques, L.S.; Galvanini, P.A.; Favaretto, F.; Santana, T.F.; Pamphile, J.A. Independência ou morte: a apoptose como mecanismo de defesa. **Arquivos de Ciências da Saúde**. v.17, n.1, 2013.

Gazzinelli, R.T.; Oswald, I.P.; Hieny, S.; James, S.L.; Sher, A. The microbicidal activity of interferon-gamma-treated macrophages against *Trypanosoma cruzi* involves an Larginine-dependent, nitrogen oxide-

mediated mechanism inhibitable by interleukin-10 and transforming growth factor beta. **European Journal of Immunology**. v.10, 1992.

Ginsburg, H.; Ward, S.A.; Bray, P.G. An integrated model of chloroquine action. **Parasitology Today**. v.15, 1999.

Gomes, A.P.; Vitorino, R.R.; Costa, A.P.; Mendonça, E.G.; Oliveira, M.G.; Siqueira-Batista, R. Malária grave por *P. falciparum*. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**. v.23, n.3, 2011.

Gonçalves, A.A.; Garcia, A.R.; Arruda, R.P.; Júnior, W.B.; Júnior, J.B.L.; Kahwage, P.R.; Silva, G.R. A suplementação alimentar com ácidos graxos insaturados melhora a qualidade do sêmen criopreservado de búfalos (*Bubalus bubalis*) pós descongelação. **Semina: Ciências Agrárias**. v.35, n.5, 2014.

Gontijo, B.; Carvalho, M.L.R. Leishmaniose tegumentar americana. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v.36, n.1, 2003.

Good, M. F.; Xu, H.; Wykes, M.; Engwerda, C. Development and regulation of cell-mediated immune responses to the blood stages of malaria: Implications for vaccine research. **Annual Review of Immunology**. v.23, 2005.

Gutierrez, A.; Tolezano, L.F.C.; Westphalen, E.V.N.; Hiramoto, I.M.; Shaw, J.J.; Tolezan, J.E. Estimativa do número mínimo de promastigotas de *Leishmania (Viannia) braziliensis* necessário para a proliferação em sistema de cultivo em microplacas. **Bepa**. v.7,n.84, 2010.

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. **Anal. Biochem**. v.126, n.1, 1982.

Green, S.J.; Meltzer, M.S.; Hibbs, J.B. Jr.; Nacy, C.A. Activated macrophages destroy intracellular *Leishmania major* amastigotes by an L-arginine dependent killing mechanism. **The Journal of Immunology**. v.144, 1990.

Grimaldi, G.; Tesh, R.B.; Leishmaniasis of the New World: Current Concepts and Implications for Future Research. **Clinical Microbiology Reviews**. v.16, n.3, 1993.

Glickman, M.H.; Ciechanover, A. The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiological Reviews*. v.82, n.2, p.373-428, 2002.

Grivicich, I.; Regner, A.; Rocha, A.B. Morte celular por apoptose. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v.53, n.3, 2007.

Horikawa, M.M.; Peña, M.S. Apoptose e mimetismo apoptótico em *Leishmania*: estratégias para uma infecção bem sucedida. **Revista da biologia**. v.6b, 2011.

Janeway, C. J.; *Imunobiologia: o sistema imunológico na saúde e a na doença*, 4^a ed., editora Artes Médicas Sul Ltda: Porto Alegre, 1999.

Jarvis, M.; Fryknas, M.; D'arc, P.; Sun, C.; Rickardson, L.; Gulbo, J.; Haglund, C.; Nygren, P.L.; Larsson, R. Piperlomagumine induces inhibition of the ubiquitin-proteasome system in cancer cells. **Biochemical Biophysical Research Communications**. v.431, p.117-123, 2013.

Joly, A. B. **Botânica: introdução à taxonomia vegetal**. 12 ed. São Paulo: Câmara Brasileira do Livro, p. 777,1998.

Júnior, H.G. **Produção de fator de necrose tumoral (TNF) em hemoculturas humanas induzida por agonistas de TLR2 (*too1*-Like receptor 2): modulação pelo fator ativador de plaquetas (PAF)**. Dissertação - Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical, Goiânia, 2008.

Kaye, P.; Scott, P. Leishmaniasis: complexity at the host – pathogen interface. **Nature Publishing Group**. v.9, n.8, 2011.

Kedzierski, L.; Evans, K.J. Immune responses during cutaneous and visceral *leishmaniasis*. **Parasitology**. v.141, 2014.

Koff, A. B.; Rosen, T. Treatment of cutaneous leishmaniasis. **Journal of the American Academy of Dermatology**. v.31, n.5, 1994.

Kuckelhaus, C.S. **Influência da pravastatina na evolução da lesão, capacidade fagocitária, produção de radicais de oxigênio, nitrogênio e fator de necrose tumoral- α em camundongos infectados com *L.amazonensis***. 2011a. 148f. Tese - Núcleo de Medicina Tropical. Brasília. 2011.

Kuckelhaus, S.A.S. **Toxicidade e atividade antiparasitária da filosseptina-1 um peptídeo de *Phyllomedusa hypochondrialis* (Amphibia)**. 2007b. 153f. Tese – Ciências Médicas. Brasília, 2007.

Lacerda-Queiroz, N.; Teixeira, M.M.; Teixeira, A.L. Imunopatogênese da malária cerebral. **Revista Brasileira de Neurologia**. v.44, n.1, 2008.

Laskay, T.; Van Zandbergen, G.; Solbach, W. Neutrophil granulocytes – Trojan horses for *Leishmania major* and other intracellular microbes?. **Trends in Microbiology**. v.11, n.5, 2003.

Liese, J.; Schleicher, U.; Bogdan, C. The Innate immune response against *Leishmania* parasites. **Immunobiology**. v.213, 2008.

Liew, F.Y.; Millott, S.; Parkinson, C.; Palmer, R.M. Jr.; Moncada, S. Macrophage killing of *Leishmania* parasite *in vivo* is mediate by nitric oxide from L-arginine. **The Journal of Immunology**. v.144, 1990.

Lima, G.B. **Biogênese e função dos corpúsculos lipídicos na infecção pelo vírus da dengue**. 2011. 131f. Dissertação (Mestrado) – Instituto Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro. 2011.

Machado, P.R.; Rosa, M.E.; Costa, D.; Mignac, M.; Silva, J.S.; Schriefer, A.; Teixeira, M.M.; Bacellar, O.; Carvalho, E.M. Reappraisal of the immunopathogenesis of disseminated leishmaniasis: in situ and systemic immune response. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**.v.105, n.8, 2011.

Machado, F.S. **Avaliação da atividade citotóxica e indução de apoptose em linhagem de câncer colorretal tratada com a piplartina**. 2016. 80f. Dissertação (Mestrado) – Universidade de Caxias do Sul, Instituto de Biotecnologia, Caxias do Sul, 2016.

Marsden, P.D. Mucosal leishmaniasis ('espúndia' Escomel, 1911). *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*. v.80,1986.

Mata, J. P. **Indução de apoptose em macrófagos de camundongos BALB/c pela infecção in vitro com *Leishmania (Leishmania) amazonensis***. 2007. 88f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Departamento de Bioquímica e Imunologia, Belo Horizonte. 2007.

Mayhew, T.M.; Myklebust, R.; Whybrow, A.; Jenkins, R. Epithelial integrity, cell death and cell loss in mammalian small intestine. **Histology and histopathology**. v.14, n.1, 1999.

Melo, R.C.N.; Ávila, H.D.; Fabrino, D.L.; Almeida, P.E.; Bozza, P.T. Macrophage lipid body induction by chagas disease in vivo: putative intracellular domains for eicasonoid formation during infection. **Tissue and Cell**. v.35, n.1, 2003.

Melo, R.C.N.; Dvorak, A.M. Lipidic body-phagosome interaction in macrophages during infections diseases: Host defense or pathogen survival strategy? **Plos Pathogens**. v.8, n.7, 2012.

Melo, M.N. Leishmaniose visceral no Brasil: desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Parasitologia Veterinária**. v.23, 2004.

Mendonça, S.C.; Coutinho, S.G.; Amendoeira, R.R.; Marzochi, M.C.; Pirmez, C. Human American cutaneous leishmaniasis (*Leishmania b.braziliensis*) in Brazil: lymphoproliferative responses and influence of therapy. **Clinical and Experimental Immunology**.v.64, n.2, 1986.

Miller, L. H.; Baruch, D. I.; Marsh, K.; Doumbo, O. K. The pathogenic basis of malaria. **Nature**. v. 415, 2002.

Ministério da Saúde. Disponível em:
<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/o-ministerio/principal/leia-mais-o-ministerio/662-secretaria-svs/vigilancia-de-a-a-z/malaria/11347-tratamento>.
Acessado em: Dezembro, 2017.

Monzote, L. Current treatment of Leishmaniasis: a review. **The Open antimicrobial Agents Journal**. v.1, 2009.

Moraes, J.; Nascimento, C.; Lopes, P.O.M.V.; Nakano, E.; Yamaguchi, L.F.; Kato, M.J.; Kawano, T. *Schistosoma mansoni*: In vitro schistosomicidal activity of pipartine. **Experimental Parasitology**. v.127, 2011.

Morato, C.I. **Avaliação da modulação da infecção de macrófagos humanos com *Leishmania (Viannia) braziliensis* por leucotrienos**. 155f. 2013. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Goiás. Medicina Tropical, Goiânia, 2013.

Moreira, R.C.R.; Costa, G.C.; Lopes, T.C.; Bezerra, J.R.; Guerra, R.N.M.; Rêbello, J.M.M.; Ribeiro, M.N.S.; Nascimento, F.R.F.; Costa, J.M.L. Efeito leishmanicida *in vitro* de *Stachytarpheta cayennensis* (Rich.) Vahl (Verbenaceae). **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.17, n.1, 2007.

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

Muñoz, C.; Francisco, J.S.; Gutiérrez, B.; González, J. Role of the ubiquitin-proteasome systems in the biology and virulence of protozoan parasites. **Biomed Research International**. v.2015, 2015.

Muniz-Junqueira, M.I. Immunomodulatory therapy associated to anti-parasite drugs as a way to prevent severe forms of malaria. **Current Clinical Pharmacology**. v.2, 2007.

Muniz-Junqueira, M.I.; Tosta, C.E. Stages of *in vitro* phagocytosis of *Plasmodium falciparum* infected erythrocytes by human monocytes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. v.42, n.2, 2009.

Murdoch, W.J.; Wilken, C.; Young, D.A. Sequence of apoptosis and inflammatory necrosis within the formative ovulatory site of sheep follicles. **Journal of Reproduction and Fertility**. v.117, 1999.

Murphy, R.C. Free-radical-induced oxidation of arachidonoyl plasmalogen phospholipids: antioxidant mechanism and precursor pathway for bioactive eicosanoids. *Chem. Res. Toxicol.* v.14, n.5, 2001.

McDonald, P.P.; Fadok, V.A.; Bratton, D.; Henson, P.M. Transcriptional and Translational regulation of inflammatory mediator production by endogenous TGF-beta in macrophages that have ingested apoptotic cells. **Journal of Immunology.** v.11, 1999.

Nakamura, C.V.; Santos, A.O.; Vendramentto, M.C.; Luize, P.S.; Filho, B.P.D.; Cortez, D.A.G.; Ueda-Nakamura, T. Atividade antileishmaniana do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper regnellii* (Miq.) C.DC. var. *pallescens* (C.DC.) Yunck. **Revista Brasileira de Farmacognosia.** v.16, n.1, 2006.

Nogueira, F. Métodos para avaliação da atividade antimalárica nas diferentes fases do ciclo de vida do *Plasmodium*. **Revista Pan-Amazônica de Saúde.**v.1, n.3, 2010.

Oliveira-Ferreira, J.; Lacerda, M.V.G.; Brasil, P.; Ladislau, J.L.B.; Tauil, P.L.; Daniel-Ribeiro, C.L. Malaria in Brazil: an overview. **Malaria Journal.**v.9, n.115, 2010.

Olliaro, P.L.; Goldberg, D.E. The *Plasmodium* digestive vacuole: metabolic headquarters and choice drug target. **Parasitology Today.** v.11, 1995.

Onguéné, P.A.; Ntie-Kang, F.; Lifongo, L.L.; Ndom, J.C.; Sippl, W.; Mbaze, L.M. The potential of anti-malarial compounds derived from African medicinal plants. Part.I: A pharmacological evaluation of alkaloids and terpenoids. **Malaria Journal.**v.12, n.449, 2013.

Oil Red O Staining Protocol. Preparado por Roy Ellis, 2012. Disponível em: http://www.ihcworld.com/_protocols/special_stains/oil_red_o_ellis.htm. Acessado em: 10.01.2018.

Palomino, J.C.; Guerra, H.; Lumberas, H. A selective liquid médium for primary isolation of South American Leishmanias. **Tropenmedizin Und Parasitologie.** v.34, n.4, 1983.

Parmar, V.S.; Jain, S.C.; Bisht, K.S.; Jain, R.; Taneja, P.; Jha, A.; Tyagi, O.M.; Prasad, A.K.; Wengel, J.; Olsen, C.E.; Boll, P.M. Phytochemistry of the genus Piper. **Phytochemistry.** v. 46, p. 597–673, 1997.

Pastorino, A.C.; Jacob, C.M.A.; Oselka, G.W.; Carneiro-Sampaio, M.M.S. Leishmaniose visceral: aspectos clínicos e laboratoriais. **Jornal de pediatria.** v.78, n.2, 2002.

Peiter, P.C.; Franco, V.C.; Gracie, R.; Xavier, D.R.; Suárez-Mutis, M.C. Situação da malária na tríplice fronteira entre Brasil, Colômbia e Peru. **Caderno de Saúde Pública**. v.29, n.12, 2013.

Pelissari, D.M.; Cechinel, M.P.; Sousa-Gomes, M.L.; Júnior, F.E.F.L. Tratamento da leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar americana no Brasil. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**. v.20, n.1, 2011.

Pereira, B. Radicais livres de oxigênio e sua importância para a funcionalidade imunológica. **Motriz**. v.2, n.2, 1996.

Peters, N.C.; Egen, J.G.; Secundino, N.; Debrabant, A.; Kimblin, N.; Kamhawi, S.; Lawyer, P.; Fay, M.P.; Germain, R.N.; Sacks, D. In vivo imaging Reveals an essential role for neutrophils in *Leishmaniasis* transmitted by sand flies. **Science**. v.321, n.5891, 2008.

Pires, A.M.S.; Costa, G.C.; Gonçalves, E.G.R.; Alvin, A.C.; Nascimento, F.R.S. Aspectos imunológicos e clínicos da Leishmaniose Tegumentar Americana: uma revisão. *Rev.Ciênc. Saúde*. v.14, n.1, 2012.

Pirmez, C.; Yamamura, M.; Uyemura, K.; Paes-Oliveira, M.; Conceição-Silva, F.; Modlin, R.L. Cytokine patterns in the pathogenesis of human leishmaniasis. **The journal of Clinical Investigation**. v. 91, n.41, p.1390-1395, 1993.

Pick, E.; Keisari, Y. A. Simple Colorimetric Method for the Measurement of Hydrogen Peroxide Produced by Cells in Culture. **Journal of Immunological Methods**. v.38, p.161-170, 1980.

Proskuryakov, S.Y.; Konoplyannikov, A.G.; Gabai, V.L. Necrosis: a specific for of programmed cell death?. **Experimental Cell Research**. v.283, 2003.

Queiroz, S.L.; Batista, A.A. Funções biológicas do óxido nítrico. **Química Nova**. v.22, n.4, 1999.

Rabhi, S.; Rabhi, I.; Trentin, B.; Piquemal, D.; Regnault, D.; Goyard, S.; Lang, T.; Descoteaux, A.; Enninga, J.; Guizani-Tabbane, L. Lipid droplet formation, their localization and dynamics during *Leishmania major* macrophage infection. **Plos one**. v.11, n.2, 2016.

Rattan, S.I.S. Aging, anti-aging, and hormesis. **Mechanisms of ageing and development**. v. 125, 2004.

Rath, S.; Trivelin, L.A.; Imbrunito, T.R.; Tomazela, D.M.; Jesús, M.N.; Marzal, P.C. Antimoneais empregados no tratamento da Leishmaniose: Estado da Arte. *Química Nova*. v.26, n.4, 2003.

Rasmusson, B.; Descoteaux, A. Contribution of electron and Confocal Microscopy in the study of *Leishmania* – Macrophage interactions. **Microscopy and Microanalysis**. v.10, n.5, 2004.

Riss, T.L.; Moravec, R.A.; Niles, A.L.; Duellman, S.; Benink, H.A.; Worzella, T.J.; Minor, L. Cell viability assays. **Assay Guidance Manual** (Internet). Publicado em 01 de maio de 2013, atualizado em 01 de julho de 2016.

Rodrigues, W.; Nogueira, J.M. Diversidade Biológica como uma fonte de riqueza: Mito ou Realidade? Lições da competitividade Comércio Internacional de Produtos da Flora Medicinal Brasileira. **American International Journal of Contemporary Research**. v.2, n.10, 2012.

Rodríguez, N.E.; Lockard, R.D.; Turcotte, E.A.; Araújo-Santos, E.A.; Bozza, P.T.; Borges, V.M.; Wilson, M.E. Lipid bodies accumulation in *Leishmania infantum* infected C57BL/6 macrophages. **Parasite Immunology**. v.39, 2017.

Rogério, L.C. **Eficácia *in vitro* de lipossomas furtivos contendo antimoniato de meglumina e miltefosina para o tratamento da leishmaniose tegumentar americana**.31f. 2017. Trabalho de Conclusão de Curso. Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2017.

Rhee, S.G.; Chang, T.S.; Jeong, W.; Kang, D. Methods for detection and measurement of hydrogen peroxide inside and outside of cells. **Molecules and cells**. v.29, 2010.

Rahman, N.N.N.A.; Furuta, T.; Kojima, S.; Takane, K.; Mohd,M.A. Antimalarial activity of extracts of Malaysian medicinal plants.**J Ethnopharmacol**. v. 64, n.3, 1999.

Sá, M.S.**Avaliação da atividade antimalárica de substâncias obtidas de espécies vegetais nativas ou endêmicas do semi-árido brasileiro e derivados sintéticos**. 2011. 128p. Tese (Doutorado em Biotecnologia em Saúde)-Fundação Oswaldo Cruz, Centro de Pesquisas Gonçalo Moniz, Salvador. 2011.

Sant' Anna, C.M.R. Métodos de modelagem molecular para estudo e planejamento de compostos bioativos: uma introdução. **Revista Virtual de Química**.v.1,n.1, 2009.

Secretaria de Vigilância e Saúde, Brasil. Disponível em: <http://portalarquivos.saude.gov.br/images/pdf/2017/setembro/14/LT-Casos.pdf>, acessado em: 25/10/2017.

Silva, J.G.; Souza, I.A.; Higino, J.S.; Siqueira-Júnior, J.P.; Pereira, J.V.; Pereira, M.S.V. Atividade antimicrobiana do extrato de *Anacardium occidentale* Linn. em amostras multiresistentes de *Staphylococcus aureus*. **Revista Brasileira de Farmacognosia**. v.17, n.4, 2007.

Silva-Jardim, I.; Horta, M.F.; Ramalho-Pinto, F.J. The *Leishmania chagasi* proteasome: role in promastigotes growth and amastigotes survival within murine macrophages. **Acta Tropica**. v.91, n.2, 2004.

Silva, P.P. **Análise dos corpúsculos lipídicos em macrófagos humanos infectados pela cepa y do Trypanosoma cruzi e submetidos ao tratamento com a droga benzonidazol**. 2012. 91f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais. Centro de Biologia Celular, Belo Horizonte, 2012.

Silva, G.A.T. **Estudo fitoquímico das folhas e frutos de Piper caldense C.DC. (Piperaceae)**. 2013. 204f. Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal da Paraíba. Centro de Ciências da Saúde, João Pessoa. 2013.

Silva, D.G. **Padronização do cultivo de amastigotas axênicos e intracelulares de Leishmania spp. e análise da atividade leishmanicida de chalconas**. 2008. 120f. Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Santa Catarina. Centro de Ciências Biológicas, Florianópolis, 2008.

Silveira, F.T.; Lainson, R.; Gomes, C.M.C.; Laurenti, M.D.; Corbett, C.E.P. Immunopathogenic competences of *Leishmania* (V.) *braziliensis* and *L. (L.) amazonensis* in American cutaneous leishmaniasis. **Parasite Immunology**. v.31, 2009.

Silveira, F.T.; Lainson, R.; Corbett, C.E.P. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**. v.99, 2004.

Soong, L. Modulation of dendritic cell function by *Leishmania* parasites. **The Journal of Immunology**. v.180, n.7, 2008.

Souza, L.M.A.; Carneiro, M.B.H.; Resende, M.E.; Martins, L.S.; Santos, L.M.; Vaz, L.G.; Mello, P.S.; Mosser, D.M.; Oliveira, M.A.P.; Vieira, L.Q. Neutrophils have a protective role during early stages of *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. **Parasite Immunology**. v.36, n.1, 2014.

Souza, W.L.; Costa, J.M.S.; Moraes, E.A.; Coelho, V.G.; Magalhães, L.M.V.; Oliveira, R.P. Uso da coloração eosina-nigrosina na avaliação da integridade da membrana plasmática de espermatozoides de carneiros suplementados com melatonina. **Ciência Veterinária nos Trópicos**. v.18, n.2, 2015.

Sunderkotter, C.; Kunz, M.; Steinbrink, K.; Meinardus-Hager, G; Goebeler, M.; Bildau, H.; Sorg, C. Resistance of mice to experimental leishmaniasis is associated with more rapid appearance of mature macrophages *in vitro* and *in vivo*. **The Journal of Immunology**. v.151, n.9, 1993.

Sullivan, D.J. Theories on malarial pigment formation and quinoline action. **International Journal for Parasitology**. v. 32, 2002.

Schroder, K.; Hertzog, P.J.; Ravasi, T.; Hume, D.A. Interferon- α : an overview of signals, mechanisms and functions. **Journal of Leukocyte Biology**. v.75, 2004.

Teixeira, B.C.; Lopes, A.L.; Macedo, R.C.O.; Correa, C.S.; Ramis, T.R.; Ribeiro, J.L.; Reischak-Oliveira, A. Marcadores inflamatórios, função endotelial e riscos cardiovasculares. **Jornal Vascular Brasileiro**. v.13, n.2, 2014.

Toledo, D.A.M.; D'ávila, H.; Melo, R.C.N. Host lipid bodies as platforms for intracellular Survival of protozoan parasites. **Frontiers in Immunology**. v.7, n.174, 2016.

Tortora, G.J.; Funke, B.R.; Case, C.L. **Microbiologia**. 10 ed. Porto Alegre: editora artmed, 2012.

Turetz M.L.; Machado P.L.; Ko A.L.; Alves F.; Bittencourt A.; Almeida R.P. Disseminated leishmaniasis: a new and emerging form of leishmaniasis observed in northeastern Brazil. **The Journal of Infectious Diseases**. v.186, n.12, 2002.

Thipubon, P.; Uthaiyibull, C.; Kamchonwongpaisan, S.; Tipsuwan, W.; Srichairatanakool, S. Inhibitory effect of novel iron chelator, 1- (N-acetyl-6-aminoethyl)-3-hydroxy-2- methylpyridin-4-one (CM1) and green tea extract on growth of *Plasmodium falciparum*. **Malaria Journal**. v.14, v.382, 2015.

Valente, S.C. **Marcação da anexina V para imagem funcional da apoptose celular**. 2011. 71p. Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Ciências e Tecnologia, Lisboa, 2011.

Veronesi, R.; Focaccia, R. **Imunologia e Imunopatologia da malária**. Tratado de Infectologia. Editora Atheneu, 1999.

Vieira, É.L.M.; Keesen, T.S.L.; Machado, P.R.; Guimarães, L.H.; Carvalho, E.M.; Dutra, W.O.; Gollob, K.J. Immunoregulatory profile of monocytes from cutaneous leishmaniasis patients and association with lesion size. **Parasite Immunology**. v.35, n.2, 2013.

Vieira, M.G.S.; Oliveira, F.; Arruda, S.; Bittencourt, A.L.; Barbosa, A.A.; Barral-Neto, M.; Barral, A. B-cell infiltration and frequency of cytokine producing cells differ between localized and disseminated human cutaneous leishmaniasis. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**. v. 97, n.7, 2002.

Xiao, Y.; Shi, M.; Qui, Q., Huang, M.; Zeng, S.; Zou, Y.; Zhan, Z.; Liang, L.; Yang, X.; Xu, H. Piperlongumine suppresses dendritic cell maturation by reducing production of reactive oxygen species and has therapeutic potential for rheumatoid arthritis. **Journal Immunology**. v.196, n.12, 2016.

Wei, X.Q.; Charles, I.G.; Smith, A.; Ure, J.; Feng, G.J.; Huang, F.P.; Xu, D.; Muller, W.; Moncada, S.; Liew, F.Y. Altered immune response in mice lacking inducible nitric oxide synthase. **Nature**. v. 375, 1995.

WHO. World Health Organization, 2017. Disponível em: http://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5557:relatorio-da-oms-mostra-que-avancos-na-resposta-mundial-a-malaria-estao-paralisando&Itemid=812. Acessado em: dezembro/ 2017.

Zandbergen G. V.; Klinger, M.; Mueller, A.; Dannenberg, S.; Gebert, A.; Solbach, W.; Laskay, T. Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for Leishmania entry into macrophages. **The Journal of Immunology**. v. 173, 2004.

ANEXO I

(Parecer do Comitê de Ética)



Universidade de Brasília

Instituto de Ciências Biológicas
Comitê de Ética no Uso Animal

Brasília, 23 de maio de 2014.



DECLARAÇÃO

Declaramos que o projeto intitulado "**AVALIAÇÃO DO EFEITO DA PIPLARTINA E SEUS ANÁLOGOS EM CULTIVOS DE LEISHMANIA AMAZONENSIS E PLASMODIUM FALCIPARUM**", UnBDoC n.º 22199/2014, sob responsabilidade da Professora Selma Aparecida Souza Kuckelhaus foi avaliado e aprovado pela Comissão de Ética no Uso Animal (CEUA) do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade de Brasília.



Prof. Dr. Rafael Plakoudi Souto Maior
Coordenador da CEUA

*Este documento se restringe à avaliação ética do projeto supracitado e não substitui outras licenças e permissões que porventura se façam necessárias.

ANEXO II

(Artigo científico publicado em 17 de
abril de 2017)



Effect of piplartine and cinnamides on *Leishmania amazonensis*, *Plasmodium falciparum* and on peritoneal cells of Swiss mice

Keline Medeiros de Araújo-Vilges, Stefan Vilges de Oliveira, Shirley Claudino Pereira Couto, Harold Hilarion Fokoue, Gustavo Adolfo Sierra Romero, Massuo Jorge Kato, Luiz Antonio Soares Romeiro, José Roberto Souza Almeida Leite & Selma Aparecida Souza Kuckelhaus

To cite this article: Keline Medeiros de Araújo-Vilges, Stefan Vilges de Oliveira, Shirley Claudino Pereira Couto, Harold Hilarion Fokoue, Gustavo Adolfo Sierra Romero, Massuo Jorge Kato, Luiz Antonio Soares Romeiro, José Roberto Souza Almeida Leite & Selma Aparecida Souza Kuckelhaus (2017) Effect of piplartine and cinnamides on *Leishmania amazonensis*, *Plasmodium falciparum* and on peritoneal cells of Swiss mice, *Pharmaceutical Biology*, 55:1, 1601-1607, DOI: [10.1080/13880209.2017.1313870](https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1313870)

To link to this article: <http://dx.doi.org/10.1080/13880209.2017.1313870>



© 2017 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group.



Published online: 17 Apr 2017.



Submit your article to this journal [↗](#)



View related articles [↗](#)



View Crossmark data [↗](#)

Full Terms & Conditions of access and use can be found at
<http://www.tandfonline.com/action/journalInformation?journalCode=iphb20>

Download by: [189.6.16.120]

Date: 18 April 2017, At: 05:49

Effect of piplartine and cinnamides on *Leishmania amazonensis*, *Plasmodium falciparum* and on peritoneal cells of Swiss mice

Keline Medeiros de Araújo-Vilges^a, Stefan Vilges de Oliveira^b, Shirley Claudino Pereira Couto^a, Harold Hilarion Fokoue^d, Gustavo Adolfo Sierra Romero^c, Massuo Jorge Kato^d, Luiz Antonio Soares Romeiro^e, José Roberto Souza Almeida Leite^f and Selma Aparecida Souza Kückelhaus^{a,f}

^aLaboratory of Cell Immunology, Faculty of Medicine, University of Brasília Campus Darcy Ribeiro, Brasília-DF, Brazil; ^bLaboratory of Medical Parasitology and Vector Biology, Faculty of Medicine, University of Brasília, Brasília-DF, Brazil; ^cLaboratory of Leishmaniasis, Nucleo of Tropical Medicine, Faculty of Medicine, University of Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Brasília-DF, Brazil; ^dInstitute of Chemistry, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil; ^eLaboratory of Development and Therapeutic Innovation, Nucleo of Tropical Medicine, Faculty of Medicine, University of Brasília, Campus Darcy Ribeiro, Brasília-DF, Brazil; ^fLaboratory of Morphology Faculty of Medicine, University of Brasília Campus Darcy Ribeiro, Brasília-DF, Brazil

ABSTRACT

Context: Plants of the Piperaceae family produce piplartine that was used to synthesize the cinnamides. **Objective:** To assess the effects of piplartine (1) and cinnamides (2–5) against the protozoa responsible for malaria and leishmaniasis, and peritoneal cells of Swiss mice. **Materials and methods:** Cultures of *Leishmania amazonensis*, *Plasmodium falciparum*-infected erythrocytes, and peritoneal cells were incubated, in triplicate, with different concentrations of the compounds (0 to 256 µg/mL). The inhibitory concentration (IC₅₀) in *L. amazonensis* and cytotoxic concentration (CC₅₀) in peritoneal cell were assessed by the MTT method after 6 h of incubation, while the IC₅₀ for *P. falciparum*-infected erythrocytes was determined by optical microscopy after 48 or 72 h of incubation; the Selectivity Index (SI) was calculated by CC₅₀/IC₅₀. **Results:** All compounds inhibited the growth of microorganisms, being more effective against *P. falciparum* after 72 h of incubation, especially for the compounds 1 (IC₅₀ = 3.2 µg/mL) and 5 (IC₅₀ = 6.6 µg/mL), than to *L. amazonensis* (compound 1 = 179.0 µg/mL; compound 5 = 106.0 µg/mL). Despite all compounds reducing the viability of peritoneal cells, the SI were <10 to *L. amazonensis*, whereas in the cultures of *P. falciparum* the SI >10 for the piplartine (>37.4) and cinnamides 4 (>10.7) and 5 (= 38.4). **Discussion and conclusion:** The potential of piplartine and cinnamides 4 and 5 in the treatment of malaria suggest further pre-clinical studies to evaluate their effects in murine malaria and to determine their mechanisms in cells of the immune system.

ARTICLE HISTORY

Received 7 August 2016
Revised 14 March 2017
Accepted 23 March 2017

KEYWORDS

Piperlongumine; selectivity index; malaria; *Leishmaniasis*; Piperaceae

Introduction

Infectious diseases such as malaria and leishmaniasis cause thousands of deaths per year in the world, especially in tropical countries where warm and humid climate favours the dissemination of vectors (Alvar et al. 2012; Braz et al. 2013; Burrows et al. 2014).

Malaria is caused by protozoa of the genus *Plasmodium*, *P. falciparum* being the species responsible for the largest number of severe cases of the disease causing impairment of the brain, lungs, and kidneys (Gomes et al. 2011) with mortality reaching 50% of the cases (Oliveira-Ferreira et al. 2010). Leishmaniasis are caused by various protozoa species of *Leishmania* genus (Schonian et al. 2010, 2011) that manifest themselves clinically in cutaneous, mucocutaneous, and visceral forms (Pham et al. 2013). Together, these diseases are responsible for hundreds of thousands of deaths each year (Handler et al. 2015; World Health Organization 2016).

Currently, the treatment of malaria is based on the combination of artemisinin derivatives (Beteck et al. 2014). However, the

development of resistance mechanisms by infectious agents has hindered disease control (Clark et al. 2014). Similarly, for the control of leishmaniasis, the difficulties are based on the low efficacy and high toxicity of antimony derivatives and amphotericin B, including its liposomal formulation and high cost (Monzote 2009). Together, these difficulties stimulate the search for new therapeutic agents.

In Northeast Brazil, plants of the Piperaceae family are known to produce compounds with microbicide activities (Parmar et al. 1997). Among these, piplartine (3,4,5-trimethoxycinnamoyl-*N*-dihydropyridin-2-one), also known as piperlongumine, found in the *Piper* genus (Bezerra et al. 2013) presents anti-inflammatory, antitumor, antifungal and antiparasitic effects (Raj et al. 2011; Moraes et al. 2011; Adams et al. 2012; Rao et al. 2012). Given these findings, piplartine has been used as a scaffold for synthesis of other amides, such as cinnamides, using the molecular simplification strategy to establish relation between chemical structures and their biological effects (Fokoue 2015).

The effectiveness of a bioactive compound is characterized by its microbicidal effect and toxicity to mammalian cells

CONTACT Selma Aparecida Souza Kückelhaus  selmask@gmail.com, selmak@unb.br  Area of Morphology, Faculty of Medicine, University of Brasília, 70910-900, Brasília, DF, Brazil

© 2017 The Author(s). Published by Informa UK Limited, trading as Taylor & Francis Group. This is an Open Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

ANEXO III

(Reagentes e soluções)

Álcool isopropílico a 60%

Álcool isopropílico -----60mL

Água destilada----- 40 mL

Manter bem fechado em um recipiente de vidro na temperatura ambiente.

Bicarbonato de sódio (NaH₂CO₃) 7,5%

Bicarbonato de sódio -----7,5 g

Água milique-----100 mL

Filtrar com filtro 0,22 µm e armazenar a 4°C.

Hematoxilina de Harris

Lote: 15041

Fabricada: 04/2015

Vencimento: 04/2019

MTT

[3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide] (MTT) (Sigma-Aldrich)-----5mg

Água milique-----1mL

Pesar e dissolver ao abrigo da luz.

Meio de cultura RPMI 1640, pH 7,2

a) Estoque

1 frasco de RPMI 1640 medium , R4130-1L cell culture tested (Sigma) , modificação HEPES, com L-glutamina e 25mM HEPES, sem bicarbonato de sódio

Gentamicina-----25,0 mg/L
Água milique-----1000 mL

b) RPMI 1640, pH 7,2 (incompleto)

RPMI 1640 (Solução estoque)-----97,36 mL
NaH₂CO₃ 7,5%-----2,64 mL

c) Meio RPMI 1640, pH 7,2 (completo)

RPMI 1640, PH 7,2, 1640 (sol. Estoque)-----87,36 mL
Bicarbonato de sódioNaH₂CO₃ a 7,5%-----2,64 mL
Soro fetal bovino (10%)-----10,0 mL

Meio para montagem das lamínulas utilizando gelatina

Gelatina caseira sem sabor e sem cor-----10 g
Água destilada-----60 mL
Glicerol-----70 mL
Fenol-----0,25 g

Dissolver a gelatina na água destilada quente o suficiente para derretê-la;

Adicionar o fenol e o glicerol;

Homogeneizar bem e transferir para tubos falcon de 15 mL ou preparar alíquotas em eppendorf;

Manter a 4°C.

Oil red O® 1-([4-(Xylylazo)xylyl]azo)-2-naphthol, 1-[2,5-Dimethyl-4-(2,5-dimethylphenylazo)phenylazo]-2-naphthol

Estoque

Oil red-----0,5 g
Álcool isopropílico-----100 mL

Dissolver 0,5 g de Oil red em 80 mL de álcool isopropílico levemente aquecido em banho-maria 56°C (overnight);

Completar o volume com 20 mL de álcool isopropílico e homogeneizar levemente a solução;

Conservar em temperatura ambiente em vidro envolvido em papel laminado.

Uso

Diluir 15 mL do estoque em 10 mL de água destilada;

Deixar descansar por 10 minutos em temperatura ambiente;

Filtrar com papel filtro nº1 de 2 vezes;

Filtrar com filtro 0,45 um.

Paraformaldeído a 4%

Paraformaldeído-----4 g
STF pH 7,2-----100 mL

Misturar e aquecer a 65°C, em capela;

Colocar algumas gotas de NaOH a 1M até a solução ficar límpida;

Deixar esfriar;

Verificar o pH (Deve se manter entre 7,2 e 7,4);

Guardar sob refrigeração a 4°C.

Sodium dodecyl sulfate (SDS)

SDS-----10 g
Água destilada-----100 mL

Solução de nigrosina 0,05%

Nigrosina-----0,05 g
Tampão fosfato-----100 mL
Filtrar e colocar em frasco âmbar;
Armazenar a 4 °C

Solução Salina Tamponada Fosfato (STF) pH 7,2

Fosfato de sódio dibásico anidro - Na_2HPO_4 (MM 141,96g/mol)-----8,15g
Fosfato de potássio monobásico anidro - KH_2PO_4 (diácido)
(MM 136,10g/mol) -----2,45 g
Cloreto de sódio NaCl - (MM 58,44g/mol)-----4,5 g
Água milique-----1000 mL
Ajustar pH para 7,2;
Levar a autoclave e armazenar a 4 ° C.

Solução de Greiss

Solução estoque de sulfanilamida a 2% em H_3PO_4 a 5%

Ácido fosfórico H_3PO_4 -----2,5 mL
Água milique-----47,5 mL
Sal de sulfanilamida (Sigma)-----500 mg
Retirar 25mL da solução de H_3PO_4 a 5% e acrescentar os 500 mg do Sal de sulfanilamida, homogeneizar em agitador magnético e armazenar em frasco âmbar sob refrigeração.

Need 0,2 %

N-(1-naphtyl) ethyl-enediamine (Sigma)-----50 mg

Água milique-----25 mL

Armazenar em frasco âmbar sob refrigeração.

Solução de uso

Sulfanilamida a 2 %-----5 mL

Need a 0,2 %-----5 mL

Preparar 1 hora antes do término do período de incubação.

Schneider® para cultivo de *L. amazonensis*

Schneider® (Sigma - Aldrich, St. Louis, USA),

Soro fetal bovino inativado (Sigma - Aldrich, St. Louis, USA) a 10%

Gentamicina (40 mg/mL) (Schering Plough, São Paulo, Brasil)

Tampão para corante giemsa (pH 7,2)Na₂HPO₄(MM 268,07)-----3,2 gKH₂PO₄(MM 174,18)-----6,63 g

Água destilada-----1000 mL

ANEXO IV

(tabelas)

Tabela 11. Efeito da piplartina na aderência das células peritoneais dos camundongos Swiss

Células aderidas sobre as lamínulas											
Mac	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
16100	9850	14500	11790	13500	9670	11800	9580	10860	9960	10830	11790
15800	12940	11500	12130	13200	12000	13700	10800	10270	11800	12250	10890
15280	12400	14330	14110	12200	9350	11880	10720	10280	12600	13500	10580
16200	15000	14000	15800	15500	13500	13580	12800	13900	14000	13200	11500
15500	15500	15780	13500	14600	13800	13700	11000	14900	12500	13980	12600

Mac: Macrófagos não infectados;

Tabela 12. Efeito da cinamida 5 na aderência das células peritoneais dos camundongos Swiss

Células aderidas sobre as lamínulas											
Mac	0,25	0,5	1	2	4	8	16	32	64	128	256
5460	3160	3900	2980	3900	2790	3990	2780	3170	4150	4630	3080
3780	2490	4410	3060	3350	3450	3370	3880	4340	3750	3630	3990
5790	4670	3970	4690	3740	3430	4320	5650	5510	5200	6330	4820
6030	5340	4810	4320	5000	5280	4470	4840	5030	5070	4670	4210
4890	5190	5030	4260	3630	3680	5220	4820	5270	4610	5130	5000

Mac: Macrófagos não infectados;

Tabela 13. Efeito microbicida da piplartina nas formas amastigotas de *L. amazonensis* em macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (A, B e C).

A.

% Macrófagos infectados						
Grupos ($\mu\text{g/mL}$)						
	Controle	0,25	1	4	16	64
Animal 1	95,5	89,5	84,5	89	83,5	87
Animal 2	94,5	91	94,5	89,5	78,5	89,5
Animal 3	89	89,5	81	95,5	49	67
Animal 4	93	90,5	85	90,5	62	89
Animal 5	87	95,5	66	91,5	84,5	68,5
Animal 6	91,5	87,5	88	83,5	89	80,5

B.

Média de leishmânias por macrófagos

Grupos ($\mu\text{g/mL}$)

	Controle	0,25	1	4	16	64
Animal 1	6,7	3,4	4,5	4,6	4	3
Animal 2	4,2	5,3	4,7	4,2	4,3	3
Animal 3	4	4,2	5,6	3,7	1,4	3,3
Animal 4	3,8	5,3	5,6	5,3	3	3,5
Animal 5	5,8	4,5	5,7	4	4,8	3,8
Animal 6	4,3	4,8	3,6	3,9	5,6	2,6

C.

Índice de infecção						
Grupos ($\mu\text{g/mL}$)						
	Controle	0,25	1	4	16	64
Animal 1	642,5	300,5	382,5	406,5	333	264
Animal 2	397	482,5	439,5	375,5	335,5	291
Animal 3	352	373,5	450	352	67,5	223
Animal 4	357,5	483,5	475	480	186	313
Animal 5	508	432	377	367,5	401,5	259,5
Animal 6	396,5	419	321	329	500	207,5

Tabela 14. Efeito microbicida da cinamida 5 nas formas amastigotas de *L. amazonensis* em macrófagos peritoneais de camundongos Swiss (A, B e C).

A.

% Macrófagos infectados						
Grupos ($\mu\text{g/mL}$)						
	Controle	0,25	1	4	16	64
Animal 1	95,5	97	81,5	88	96	84,5
Animal 2	93	97,5	95,5	93	93	83,5
Animal 3	93,5	95,5	93,5	91,5	93	83,5
Animal 4	93	79,5	87,5	85,5	94	88
Animal 5	87	94,5	85,5	94	91,5	87,5
Animal 6	91,5	76	85	83	94,5	87

B.

Média de leishmânias por macrófagos

Grupos ($\mu\text{g/mL}$)

	Controle	0,25	1	4	16	64
Animal 1	6,7	4,8	6,1	4,5	5,1	4,2
Animal 2	5,8	4,6	5,4	6	4,3	3,2
Animal 3	5,9	5,4	4,4	6,9	5	3,2
Animal 4	3,8	5,3	4,3	5,7	5	4,3
Animal 5	5,8	5,2	4,3	6,7	4,7	3,6
Animal 6	4,3	5,4	5,4	5,3	5	3,6

C.

Índice de infecção						
Grupos ($\mu\text{g/mL}$)						
	Controle	0,25	1	4	16	64
Animal 1	642,5	465,5	495,5	400	488	351,5
Animal 2	541	446	520	560	398	264,5
Animal 3	549	515,5	410	631,5	462	270,5
Animal 4	357,5	422	378	491,5	472,5	377
Animal 5	508	495,5	364	631,5	432,5	316,5
Animal 6	396,5	408,5	461	437,5	476,5	310,5

Tabela 15. Efeito da piplartina na aderência dos macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis*

Células aderidas sobre as lamínulas						
Grupos ($\mu\text{g/mL}$)						
Mac	Leish	0,25	1	4	16	64
7500	6500	5100	4650	5620	4800	3500
7000	5500	4010	4600	3510	3850	3600
7200	6000	4240	4100	5180	4100	3460
6990	5500	4230	4650	3210	4180	4500
7320	6280	3740	4350	3270	4510	3600
7250	6610	4260	4100	4060	4350	3750

Mac: Macrófagos não infectados; Leish: Macrófagos infectados com *Leishmania*.

Tabela 16. Efeito da cinamida 5 na aderência dos macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis*

Células aderidas sobre as lamínulas						
Grupos ($\mu\text{g/mL}$)						
Mac	Leish	0,25	1	4	16	64
7500	6500	4800	5210	3700	4800	3900
7000	5500	5070	5310	5000	5020	4700
7200	6000	4780	5840	5000	4600	4650
6990	5500	4570	5280	5190	5190	3450
7320	6280	4900	4840	4100	5080	3800
7250	6610	5260	5930	5000	5090	4230

Mac: Macrófagos não infectados; Leish: Macrófagos infectados com *Leishmania*.

Tabela 17. Efeito da piplartina na produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis*.

Produção de peróxido de hidrogênio (μM)							
Grupos ($\mu\text{g/mL}$)							
Macrófagos	PMA	<i>Leishmania</i>	0,25	1	4	16	64
3,091	8,158	3,091	56,296	10,692	0,051	0,000	1,571
0,001	13,225	1,571	0,000	1,064	0,000	0,000	0,000
0,009	26,400	0,051	0,000	0,051	0,001	2,078	0,000
0,002	0,557	0,051	0,051	0,000	0,000	0,051	1,064
0,003	1,571	0,557	0,557	0,000	0,050	0,000	0,051
2,078	3,091	0,557	0,000	0,557	0,002	0,051	0,000
1,064	0,557	0,557	0,000	0,051	0,003	0,051	0,557
0,600	0,557	2,584	0,000	1,064	0,002	0,000	0,051

PMA: Acetato de forbol miristato.

Tabela 18. Efeito da cinamida 5 na produção de peróxido de hidrogênio por macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis*.

Produção de peróxido de hidrogênio (μM)							
Grupos ($\mu\text{g/mL}$)							
Macrófagos	PMA	<i>Leishmania</i>	0,25	1	4	16	64
3,091	8,158	3,091	0,000	0,000	1,571	0,000	0,5570
0,000	13,225	1,571	0,000	0,000	1,571	0,000	0,000
0,000	26,400	0,051	0,051	18,292	0,557	0,000	1,064
0,000	0,557	0,051	0,000	9,678	1,571	744,412	0,0510
0,000	1,571	0,557	0,557	696,78	0,000	45,148	0,051
2,078	3,091	0,557	2,584	40,081	0,000	7,651	9,171
1,064	0,557	0,557	0,051	1,064	0,000	0,051	0,557
0,557	0,557	2,584	0,051	0,051	0,051	1,064	0,000

PMA: Acetato de forbol miristato.

Tabela 19. Efeito da piplartina na produção de nitrito por macrófagos peritoneais infectados com *L .amazonensis*.

Nitrito (μM)							
Grupos ($\mu\text{g/mL}$)							
Macrófagos	LPS	<i>Leishmania</i>	0,25	1	4	16	64
9,680	11,280	5,182	8,595	7,490	10,749	9,680	11,280
9,139	10,216	3,947	7,490	9,680	10,216	10,749	10,216
6,927	40,880	5,182	14,428	10,216	9,680	10,749	8,595
3,296	8,045	6,356	5,182	4,574	5,182	5,775	4,574
4,574	6,356	3,296	2,611	6,356	4,574	4,574	3,947
7,490	6,927	4,574	2,611	5,775	5,182	11,808	4,574
3,947	6,356	4,574	3,947	9,139	6,356	2,611	10,749
3,947	6,356	3,947	3,947	6,356	5,775	5,182	3,296
3,296	5,182	4,574	2,611	8,045	5,182	8,595	3,9470

LPS: Lipopolissacarídeo.

Tabela 20. Efeito da cinamida 5 na produção de nitrito por macrófagos peritoneais infectados com *L. amazonensis*.

Nitrito (μM)							
Grupos ($\mu\text{g/mL}$)							
Macrófagos	LPS	<i>Leishmania</i>	0,25	1	4	16	64
9,680	11,280	5,182	8,595	9,139	11,280	15,470	10,216
9,139	10,216	3,947	18,080	9,139	9,680	14,949	12,334
6,927	40,880	5,182	35,882	7,490	10,749	11,280	67,470
3,296	8,045	6,356	5,775	11,808	11,808	0,000	1,047
4,574	6,356	3,296	8,595	5,775	3,947	5,182	3,296
7,490	6,927	4,574	9,680	4,574	3,296	5,182	5,182
3,947	6,356	4,574	3,947	8,045	5,182	4,574	3,296
3,947	6,356	3,947	3,947	5,775	4,574	4,574	2,611
3,296	5,182	4,574	10,216	7,490	4,574	3,947	2,611

LPS: Lipopolissacarídeo.

Tabela 21. Efeito da piplartina na formação de corpúsculos lipídicos por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis* (A, B e C).

A.

% Macrófagos com corpúsculos lipídicos								
Grupos ($\mu\text{g/mL}$)								
	Mac	LPS	Leish	0,25	1	4	16	64
Animal 1	5,0	67,5	75,8	79,5	84,0	80,5	84,5	4,5
Animal 2	3,0	80,0	77,5	87,0	88,5	88,5	80,0	49,0
Animal 3	2,0	73,5	80,8	77,5	87,0	92,0	85,5	33,5
Animal 4	8,5	81,0	79,5	89,0	79,0	64,0	70,0	7,0
Animal 5	0,0	75,0	84,5	80,0	73,0	72,6	71,5	37,5
Animal 6	0,0	80,5	74,0	84,5	65,0	81,5	67,5	57,0

Mac: Controle macrófagos; LPS: Lipopolissacarídeo, controle positivo;

Leish: Controle leishmânia, macrófago infectado com leishmânia.

B.**Média de corpúsculos lipídicos por macrófagos**

	Grupos ($\mu\text{g/mL}$)							
	Mac	LPS	Leish	0,25	1	4	16	64
Animal 1	6,7	5,5	5,1	8,9	5,1	5,4	5,8	8,8
Animal 2	6,7	5,4	6,2	7,3	5,0	5,6	5,9	7,7
Animal 3	6,0	4,7	5,8	11,2	6,8	5,4	5,4	6,3
Animal 4	4,0	4,9	8,2	11,9	9,5	7,6	5,7	4,2
Animal 5	0,0	7,4	7,0	11,8	9,6	6,3	5,7	7,7
Animal 6	0,0	4,8	7,6	11,1	12,0	7,2	6,6	6,2

Mac: Controle macrófagos; LPS: Lipopolissacarídeo, controle positivo;

Leish: Controle leishmânia, macrófago infectado com leishmânia.

C.

Índice Corpuscular								
Grupos (µg/mL)								
	Mac	LPS	Leish	0,25	1	4	16	64
Animal 1	33,5	374,0	381,3	704,5	430,0	435,0	494,0	39,5
Animal 2	20,0	432,5	473,0	639,0	445,5	496,5	471,0	378,0
Animal 3	12,0	342,0	462,0	871,5	589,0	495,5	465,0	212,0
Animal 4	34,0	394,0	671,0	1060,0	750,5	489,0	397,5	29,5
Animal 5	0,1	551,5	591,0	944,0	703,5	459,1	406,5	290,0
Animal 6	0,1	386,5	572,5	936,5	781,0	588,0	448,0	354,0

Mac: Controle macrófagos; LPS: Lipopolissacarídeo, controle positivo; Leish: Controle leishmania, macrófago infectado com leishmânia.

Tabela 22. Efeito da cinamida 5 na formação de corpúsculos lipídicos por macrófagos peritoneais de camundongos Swiss infectados com formas amastigotas de *L. amazonensis* (A, B e C).

A.

% Macrófagos com corpúsculos lipídicos								
Grupos ($\mu\text{g/mL}$)								
	Mac	LPS	Leish	0,25	1	4	16	64
Animal 1	5,0	67,5	75,8	80,0	93,0	86,5	94,0	70,5
Animal 2	3,0	80,0	77,5	87,0	94,0	87,0	85,5	72,5
Animal 3	2,0	73,5	80,8	90,5	85,0	85,0	95,0	79,5
Animal 4	8,5	81,0	79,5	86,5	83,5	91,5	90,5	76,5
Animal 5	0,0	75,0	84,5	85,5	90,5	95,0	83,5	84,5
Animal 6	0,0	80,5	74,0	92,5	90,0	93,5	87,0	90,0

Mac: Controle macrófagos; LPS: Lipopolissacarídeo, controle positivo;

Leish: Controle leishmânia, macrófago infectado com leishmânia.

B.**Média de corpúsculos lipídicos por macrófagos**

	Grupos ($\mu\text{g/mL}$)							
	Mac	LPS	Leish	0,25	1	4	16	64
Animal 1	6,7	5,5	5,1	8,0	6,6	5,9	9,4	8,5
Animal 2	6,7	5,4	6,2	7,4	7,5	6,4	10,6	10,1
Animal 3	6,0	4,7	5,8	6,7	6,4	6,1	9,4	7,3
Animal 4	4,0	4,9	8,2	6,6	6,6	5,3	7,3	5,0
Animal 5	0,0	7,4	7,0	7,3	5,6	6,1	7,5	5,8
Animal 6	0,0	4,8	7,6	8,2	6,1	6,5	6,6	5,5

Mac: Controle macrófagos; LPS: Lipopolissacarídeo, controle positivo;

Leish: Controle leishmânia, macrófago infectado com leishmânia.

C.

Índice Corpuscular								
Grupos (µg/mL)								
	Mac	LPS	Leish	0,25	1	4	16	64
Animal 1	33,5	374,0	381,3	642,5	611,0	513,5	880,0	600,5
Animal 2	20,0	432,5	473,0	641,0	701,0	554,0	906,5	733,0
Animal 3	12,0	342,0	462,0	610,5	544,0	517,5	897,5	578,5
Animal 4	34,0	394,0	671,0	571,5	554,0	486,0	660,0	382,0
Animal 5	0,1	551,5	591,0	625,0	503,5	582,5	628,0	486,5
Animal 6	0,1	386,5	572,5	754,0	552,5	610,0	572,0	490,5

Mac: Controle macrófagos; LPS: Lipopolissacarídeo, controle positivo;

Leish: Controle leishmânia, macrófago infectado com leishmânia.