

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Doutorado em Medicina Tropical

Avaliação da eficácia do (-) α -bisabolol contra *Leishmania amazonensis* através de tratamento tópico em modelo murino.

MARIANA MARGATTO ROTTINI

Rio de Janeiro
2015

Ficha catalográfica elaborada pela
Biblioteca de Ciências Biomédicas/ ICICT / FIOCRUZ - RJ

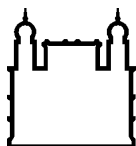
R851 Rottini, Mariana Margatto

Avaliação da eficácia do (-) α -bisabolol contra *Leishmania amazonensis* através de tratamento tópico em modelo murino / Mariana Margatto Rottini. – Rio de Janeiro, 2015.
xvii, 149 f. : il. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em
Medicina Tropical, 2015.
Bibliografia: f. 133-141

1. *Leishmania amazonensis*. 2. Óleos essenciais. 3. Atividade leishmanicida. I. Título.

CDD 616.9364



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-graduação em Medicina Tropical

MARIANA MARGATTO ROTTINI

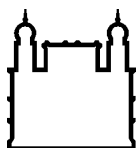
**Avaliação da eficácia do (-) α -bisabolol contra *Leishmania amazonensis*
através de tratamento tópico em modelo murino.**

Tese apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Medicina Tropical.

Orientador: Dra. Kátia da Silva Calabrese

RIO DE JANEIRO

2015



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Pós-graduação em Medicina Tropical

MARIANA MARGATTO ROTTINI

**Avaliação da eficácia do (-) α -bisabolol contra *Leishmania amazonensis*
através de tratamento tópico em modelo murino.**

ORIENTADOR: Dra. Kátia da Silva Calabrese

Aprovada em: 01 /outubro/2015

EXAMINADORES: Dr. Marcelo Pelajo Machado (Presidente)
Dr. Eduardo Caio Torres dos Santos
Dra. Fátima da Conceição Silva
Dr. Sérgio Coutinho Furtado de Mendonça
Dra. Silvia Amaral Gonçalves da Silva

SUPLENTE: Dr. Eduardo Fonseca Pinto
Dr. Igor de Almeida Rodrigues

Rio de Janeiro, 01 de outubro de 2015.

À minha Mãe

Agradecimentos

À minha família, por estar presente em todos os momentos da minha vida.

À minha tia Izabel Margatto pela ajuda infinita e por tudo que teve que ler e aprender para me ajudar.

À Dra. Kátia Calabrese pela atenta orientação, amizade, companheirismo e carinho.

À Dra. Celeste Freitas por me ensinar como funciona um laboratório, pelas inúmeras ajudas, pela amizade e carinho.

Ao Dr. Marcelo Pelajo por toda ajuda, ensinamentos e revisão da tese.

Aos amigos do laboratório de Imunomodulação e Protozoologia, Luiz Otávio, Luiz d'Escoffier, Tânia Zaverucha, Flávia Cardoso, Carolina Salles, Fernando Almeida, Daiana Haroim, pelas ideias, conselhos, conversas, cálculos e ajuda na realização dos experimentos.

À CAPES, pela bolsa concedida.

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

Resumo

As opções de tratamento para leishmaniose tegumentar, atualmente disponíveis, apresentam problemas envolvendo a eficácia, os efeitos colaterais e os casos de resistência do parasito relacionados aos principais fármacos utilizados. Além disso, todos os fármacos são de administração parenteral, o que depende de profissionais experientes e deslocamento do paciente ao local de tratamento. Por esse motivo, muitos abandonam o tratamento, o que leva ao surgimento de cepas de *Leishmania* resistentes. Isso tem incentivado a pesquisa de novos agentes, com características leishmanicidas que apresentem menores efeitos colaterais e que sejam de administração mais fácil. Assim, a utilização de produtos naturais, derivados de plantas, vem despertando o interesse de pesquisadores na busca de tratamentos alternativos para a leishmaniose cutânea. Alguns óleos essenciais têm mostrado, em ensaios experimentais, uma efetiva ação leishmanicida, o que faz desses compostos promissoras opções no tratamento desta doença. Resultados obtidos, anteriormente, pelo nosso grupo, demonstraram que o (-)- α -bisabolol apresenta potente atividade leishmanicida, *in vitro*, contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*. Ao avaliarmos a citotoxicidade deste óleo demonstramos que este composto apresentou maior atividade citotóxica para os parasitos que para os macrófagos. Além disso, foi possível demonstrar alterações morfológicas e ultraestruturais nos parasitos, tanto em formas promastigotas, como em formas amastigotas interiorizadas por macrófagos tratadas com o (-)- α -bisabolol, através da microscopia eletrônica de transmissão. Baseados nestes resultados *in vitro*, obtidos pelo nosso grupo, desenvolvemos três formulações tópicas contendo (-)- α -bisabolol com diferentes concentrações, as quais foram utilizadas no tratamento da leishmaniose experimental no modelo murino. Durante o tratamento com as formulações não observamos alterações que pudessem estar relacionadas com a citotoxicidade ao tratamento tópico. Observamos que os animais tratados com a formulação contendo 1.000 mg/kg/dia de (-)- α -bisabolol mostraram regressão e cicatrização das lesões, com diminuição da carga parasitária. Os animais tratados com 500 mg/kg/dia e 250 mg/kg/dia de (-)- α -bisabolol também mostraram regressão e cicatrização das lesões, entretanto, sem diminuição da carga parasitária. Diante dos resultados analisados, podemos destacar que o (-)- α -bisabolol possui ação leishmanicida, dose dependente, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, demonstrando ter eficácia no tratamento da leishmaniose experimental, o que poderá transformá-lo num composto promissor, através de um estudo futuro que possibilite aprimorar a sua capacidade leishmanicida.

Palavras-chave: *Leishmania amazonensis*, óleos essenciais, atividade leishmanicida.

Abstract

The treatment currently available for cutaneous leishmaniasis have problems involving its efficacy, side effects and resistance cases. In addition, all drugs are administrated parenterally. For this reason, many patients abandon the treatment, which leads to the emergence of *Leishmania* resistant strains. This has encouraged the search for new agents with antileishmanial features that have fewer side effects. Thus, the use of natural products derived from plants has aroused the interest of researchers in the search for alternative treatments for cutaneous leishmaniasis. Some essential oils or isolated compounds from plants have been shown, in experimental trials, an effective activity against *Leishmania*, which makes these compounds promising options for the treatment of this disease. Results obtained previously by our group demonstrated that (-) α -bisabolol has potent leishmanicidal activity *in vitro* against promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania amazonensis*. When evaluating the cytotoxicity of this oil we demonstrated that this compound present stronger cytotoxic activity against parasites than macrophages. Furthermore, morphological and ultrastructural changes of the parasite were demonstrated by transmission electron microscopy, both in promastigotes and amastigotes treated with (-) α -bisabolol. Due to the *in vitro* results obtained by our group, we have developed three topical formulations containing (-) α -bisabolol with different concentrations. During treatment with the formulations changes that might be related to cytotoxicity to topical treatment were not observed. Animals treated with the formulation containing 1.000 mg/kg/day (-) α -bisabolol, showed regression and healing of the lesions with reduction in parasite load. The animals treated with 500 mg/kg/day and 250 mg/kg/day (-) α -bisabolol also showed regression and healing of the lesions, however, without reduction of the parasitic load. On the analyzed results, we emphasize that the (-) α -bisabolol has leishmanicidal action both *in vitro* and *in vivo*, showing be effective in the treatment of experimental leishmaniasis, which could turn it into a promising compound through a future study enables leishmanicidal improve its capacity.

Keywords: *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, essential oils, leishmanicidal activity.

Índice

1. INTRODUÇÃO.....	18
1.1. Leishmaniose – considerações gerais	19
1.2. Tratamento.....	20
1.2.1. Antimônias.....	20
1.2.2. Anfotericina B.....	21
1.2.3. Miltefosina	22
1.2.4. Paromomicina.....	22
1.2.5. Pentamidina.....	22
1.3. Contra-indicações e efeitos colaterais.....	23
1.4. Novas estratégias de tratamento.....	23
1.5. Produtos de origem vegetal	25
1.5.1. (-)α-bisabolol.....	27
2. OBJETIVO.....	31
2.2. Objetivos geral	32
2.2. Objetivos específicos.....	32
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	33
3.1. (-)α-bisabolol.....	34
3.2. Creme Lanette.....	34
3.3. Ensaio <i>in vitro</i>	34
3.3.1. Microscopia eletrônica de transmissão.....	34
3.3.2. Citometria de fluxo de formas promastigotas de <i>L.amazonensis</i>	35
3.3.3. Análise dos dados <i>in vitro</i>	35
3.4. Ensaio <i>in vivo</i>	35
3.4.1. Animais.....	35
3.5. Formulações tópicas.....	36
3.5.1. Teste de estabilidade do creme.....	36

3.5.2. Características organolépticas	36
3.5.3. Teste de centrífuga.....	37
3.6. Infecção experimental.....	37
3.7. Ensaio terapêutico com a formulação tópica.....	37
3.8. Parâmetros avaliados	38
3.8.1. Mortalidade.....	38
3.8.2. Avaliação clínica.....	38
3.8.3. Cinética da lesão.....	38
3.8.4. Coleta de sangue.....	39
3.8.4.1. Avaliação hematológica	39
3.8.4.2. Avaliação bioquímica.....	39
3.8.5. Preparação dos tecidos para histologia	40
3.8.5.1. Técnica de Hematoxilina-eosina.....	40
3.8.5.2. Técnica de Picrosirius-red.....	41
3.8.5.3. Técnica de Giemsa de Lennert.....	41
3.8.6. Reação em cadeia pela Polimerase em Tempo Real (PCR).....	41
3.8.6.1. Extração de DNA dos tecidos.....	41
3.8.6.2. Amplificação dos fragmentos.....	42
3.8.7. Análises estatísticas.....	42
3.8.8. Critério de cura.....	43
4. RESULTADOS.....	44
4.1. Experimentos <i>in vitro</i>	45
4.1.1. Microscopia eletrônica de transmissão (MET).....	45
4.2. Citometria de fluxo para análise das formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i>	48
4.3. Testes de estabilidade dos cremes.....	48
4.3.2. Características organolépticas.....	49
4.3.3. Teste de centrífuga.....	49

4.4. Experimentos <i>in vivo</i> - Ensaio terapêutico e parâmetros avaliados.....	49
4.4.1. Mortalidade e sinais clínicas	49
4.4.2. Cinética da lesão.....	50
4.5. Parâmetros hematológicas	53
4.6. Parâmetros bioquímicas	56
4.7. Análise histopatológica.....	59
4.7.1. 6 horas após o tratamento.....	59
4.7.2. 24 horas após o tratamento.....	69
4.7.3. 7 ^a dia de tratamento.....	76
4.7.4. 14 ^a dia de tratamento.....	84
4.7.5. 30 ^a dia de tratamento.....	99
4.8. Quantificação da carga parasitária.....	117
5. DISCUSSÃO.....	120
6. CONCLUSÕES.....	131
7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	133
8. ANEXO.....	142

Lista de abreviaturas

μg	micrograma
μL	microlitro
CC_{50}	concentração citotóxica 50%
CG	cromatografia gasosa
CLAE	cromatografia líquida de alta eficiência
EM	espectrometria de massas
CG/EM	cromatografia gasosa acoplada a espectrometria de massa
CLAE/RMN	cromatografia líquida de alta eficiência a acoplada ressonância magnética nuclear
DMEM	meio Eagle Dulbecco modificado
IC_{50}	concentração inibitória de 50% da população
IPP	isopentenil-pirofosfato
MET	microscopia eletrônica de transmissão
NO	óxido nítrico
PBS	tampão fosfato salino
PFA	paraformaldeído
qPCR	PCR quantitativa
RMN	ressonância magnética nuclear
ROS	espécies reativas de oxigênio
Sb^{III}	antimônio trivalente
Sb^{V}	antimônio pentavalente

Lista de tabelas e figuras

Figura 1.1. - Fórmula química estrutural do (-) α -bisabolol	28
Figura 4.1. - Microscopia eletrônica de transmissão de formas promastigotas de <i>L. amazonensis</i> .	46
Figura 4.2. - Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos de linhagem J774.G8.	47
Figura 4.3. - Resultados da citometria de fluxo de <i>L. amazonensis</i> incubadas com TMRE.	48
Figura 4.4. - Peso corporal	50
Figura 4.5. – Imagem dos camundongos da linhagem BALB/c infectados, na base da cauda, com 10^4 amastigotas de <i>L. amazonensis</i> e seus respectivos controles.	52
Figura 4.6. - Cinética das lesões	53
Tabela 4.1 - Análise hematológica – realizada no sangue dos camundongos após 6 horas de tratamento.	53
Tabela 4.2 - Análise hematológica – realizada no sangue dos camundongos após 24 horas de tratamento.	54
Tabela 4.3 - Análise hematológica – realizada no sangue dos camundongos após 7 dias de tratamento.	54
Tabela 4.4 - Análise hematológica – realizada no sangue dos camundongos após 14 dias de tratamento.	54

Tabela 4.5 - Análise hematológica – realizada no sangue dos camundongos após 30 dias de tratamento.	55
Tabela 4.6 - Análise bioquímica – realizada nos soros dos camundongos após 6 horas de tratamento.	56
Tabela 4.7 - Análise bioquímica – realizada nos soros dos camundongos após 24 horas de tratamento.	56
Tabela 4.8 - Análise bioquímica – realizada nos soros dos camundongos após 7 dias de tratamento.	57
Tabela 4.9 - Análise bioquímica – realizada nos soros dos camundongos após 14 dias de tratamento.	57
Tabela 5.0 - Análise bioquímica – realizada nos soros dos camundongos após 30 dias de tratamento.	58
Figura 4.7 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com (-) α -bisabolol 1.000mg/Kg/dia, após 6 horas de tratamento.	61
Figura 4.8 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com (-) α -bisabolol 500mg/Kg/dia, após 6 horas de tratamento.	62
Figura 4.9 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com(-) α -bisabolol 250mg/Kg/dia, após 6 horas de tratamento.	63
Figura 4.10 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com base (somente creme Lanette), após 6 horas de tratamento.	64

Figura 4.11 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com Glucantime [®] , após 6 horas de tratamento.	65
Figura 4.12 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com <i>L. amazonensis</i> , no primeiro ponto de necropsia.	66
Figura 4.13 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, não infectados mas tratados com (-) α -bisabolol 1.000mg/Kg/dia, após 6 horas de tratamento.	67
Figura 4.14 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, não infectados e não tratados, no primeiro ponto de necropsia.	68
Figura 4.15 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com(-) α -bisabolol 1.000mg/Kg/dia, após 24 horas de tratamento.	70
Figura 4.16 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados <i>L. amazonensis</i> e tratados com (-) α -bisabolol 500mg/Kg/dia, após 24 horas de tratamento.	71
Figura 4.17 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com (-) α -bisabolol 250mg/Kg/dia, após 24 horas de tratamento.	72
Figura 4.18 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados somente com base (creme Lanette), após 24 horas de tratamento.	73
Figura 4.19 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com Glucantime [®] , após 24 horas de tratamento.	74

Figura 4.20 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com <i>L. amazonensis</i> , no segundo ponto de necropsia.	75
Figura 4.21 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com (-) α -bisabolol 1.000mg/Kg/dia, após 7 dias de tratamento.	78
Figura 4.22 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com (-) α -bisabolol 500mg/Kg/dia, após 7 dias de tratamento.	79
Figura 4.23 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com (-) α -bisabolol 250mg/Kg/dia, após 7 dias de tratamento.	80
Figura 4.24 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados somente com base (creme Lanette), após 7 dias de tratamento.	81
Figura 4.25 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com Glucantime [®] , após 7 dias de tratamento.	82
Figura 4.26 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com <i>L. amazonensis</i> , no terceiro ponto de necropsia.	83
Figura 4.27 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com (-) α -bisabolol 1.000mg/Kg/dia, no 14º dia de tratamento. Coloração por HE e Giemsa de Lennert.	87
Figura 4.28 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com (-) α -bisabolol 1.000mg/Kg/dia, no 14º dia de tratamento. Coloração por Picrosirius-red.	88
Figura 4.29 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c,	89

infectados com *L. amazonensis* e tratados com (-) α -bisabolol 500mg/Kg/dia, no 14° dia de tratamento. Coloração por HE e Giemsa de Lennert.

Figura 4.30 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com *L. amazonensis* e tratados com (-) α -bisabolol 500mg/Kg/dia, no 14° dia de tratamento. Coloração por Picrosirius-red. 90

Figura 4.31 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com *L. amazonensis* e tratados com (-) α -bisabolol 250mg/Kg/dia, no 14° dia de tratamento. Coloração por HE e Giemsa de Lennert. 91

Figura 4.32 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com *L. amazonensis* e tratados com (-) α -bisabolol 250mg/Kg/dia, no 14° dia de tratamento. Coloração por Picrosirius-red. 92

Figura 4.33 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com *L. amazonensis* e tratados com base, creme Lanette, no 14° dia de tratamento. Coloração por HE e Giemsa de Lennert. 93

Figura 4.34 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com *L. amazonensis* e tratados com base, creme Lanette, no 14° dia de tratamento. Coloração por Picrosirius-red. 94

Figura 4.35 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com *L. amazonensis* e tratados com Glucantime[®], após 14 dias de tratamento. Coloração por HE e Giemsa de Lennert. 95

Figura 4.36 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com *L. amazonensis* e tratados com Glucantime[®], após 14 dias de tratamento. Coloração por Picrosirius-red. 96

Figura 4.37 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com *L. amazonensis*, no quinto ponto de necropsia. Coloração por HE e Giemsa de Lennert. 97

Figura 4.38 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com <i>L. amazonensis</i> , no quinto ponto de necropsia. Coloração por Picrosirius-red.	98
Figura 4.39 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com (-) α -bisabolol 1.000mg/Kg/dia, no 30º dia de tratamento. Coloração por HE e Giemsa de Lennert.	103
Figura 4.40 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com (-) α -bisabolol 1.000mg/Kg/dia, no 30º dia de tratamento. Coloração por Picrosirius-red.	104
Figura 4.41 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com (-) α -bisabolol 500mg/Kg/dia, no 30º dia de tratamento. Coloração por HE e Giemsa de Lennert.	105
Figura 4.42 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com (-) α -bisabolol 500mg/Kg/dia, no 30º dia de tratamento. Coloração por Picrosirius-red.	106
Figura 4.43 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com (-) α -bisabolol 250mg/Kg/dia, no 30º dia de tratamento. Coloração por HE e Giemsa de Lennert.	107
Figura 4.44 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com(-) α -bisabolol 250mg/Kg/dia, no 30º dia de tratamento. Coloração por Picrosirius-red.	108
Figura 4.45 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com base, creme Lanette, no 30º dia de tratamento. Coloração por HE e Giemsa de Lennert.	109
Figura 4.46 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com <i>L. amazonensis</i> e tratados com base, creme Lanette, no 30º dia	110

de tratamento. Coloração por Picrosirius-red.

Figura 4.47 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com *L. amazonensis* e tratados com Glucantime[®], após 30 dias de tratamento. Coloração por HE e Giemsa de Lennert. 111

Figura 4.48 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com *L. amazonensis* e tratados com Glucantime[®], após 30 dias de tratamento. Coloração por Picrosirius-red. 112

Figura 4.49 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com *L. amazonensis*, no sexto e último ponto de necropsia. Coloração por HE e Giemsa de Lennert. 113

Figura 4.50 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com *L. amazonensis*, no sexto e último ponto de necropsia. Coloração por Picrosirius-red. 114

Figura 4.51 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, não infectados mas tratados com (-)- α -bisabolol 1.000mg/Kg/dia, após 30 dias de tratamento. 115

Figura 4.52 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, não infectados e não tratados, no sexto e último ponto de necrópsia. 116

Figura 4.53 - Quantificação da carga parasitária através do PCR em tempo real – fase aguda do tratamento. 118

Figura 4.54 - Quantificação da carga parasitária através do PCR em tempo real – fase crônica do tratamento. 119

1. Introdução

1.1. Leishmaniose – considerações gerais

As leishmanioses são doenças endêmicas que constituem um grave problema de saúde pública, ameaçando cerca de 350 milhões de pessoas. Atualmente ocorrem em 98 países distribuídos em cinco continentes (World Health Organization, 2015, Alvar et al. 2012). No Brasil, a incidência desta doença de 1990 a 2005 foi de aproximadamente 19 casos em cada 100 mil indivíduos, sendo quase 90% destes casos de forma cutânea (Neves et al. 2009).

As leishmanioses são causadas por parasitos intracelulares obrigatórios, pertencentes à ordem Kinetoplastida (Honigberg, 1963, emend. Vickerman, 1976), família *Trypanosomatidae* (Doflein, 1901, emend. Grobben, 1976), gênero *Leishmania* (Ross, 1903), os quais são transmitidos aos hospedeiros vertebrados por insetos flebotômíneos. Esses parasitos apresentam-se principalmente sob as formas amastigotas nos hospedeiros vertebrados e promastigotas nos hospedeiros invertebrados.

Os vetores das leishmanioses são fêmeas de pequenos dípteros que possuem características específicas como o corpo revestido por cerdas e coloração clara (castanho claro ou cor de palha). São facilmente reconhecíveis pelo seu comportamento ao voar em pequenos saltos e pousar com as asas entreabertas (Ministério da Saúde, 2003).

A infecção do vetor ocorre quando as fêmeas de flebotômíneos fazem seu repasto sanguíneo em mamíferos infectados e ingerem macrófagos parasitados por formas amastigotas de *Leishmania*. No intestino médio do vetor ocorre o rompimento dos macrófagos, liberando as amastigotas que se diferenciam em formas flageladas denominadas de promastigotas procíclicas. Essas formas se replicam intensamente por divisão binária e, através do processo de metaciclogênese, diferenciam-se em formas promastigotas metacíclicas, que migram para a probóscide do inseto vetor (Ministério da Saúde, 2003; Sacks & Perkins, 1985). Assim, durante um novo repasto sanguíneo, essas formas infectivas são transmitidas a um novo hospedeiro. No novo hospedeiro, são fagocitadas por células do sistema fagocítico mononuclear, especialmente macrófagos. A partir daí, no interior do macrófago, dentro do fagolisossomo, as promastigotas transformam-se em amastigotas e multiplicam-se até o rompimento da célula, liberando as amastigotas que serão fagocitadas por outros macrófagos (Murray et al., 2005; Ministério da Saúde, 2003).

As manifestações clínicas da doença dependem de interações complexas relacionadas com o parasito, com a resposta imunológica e com a genética do hospedeiro, entre outros fatores (Handman, 2002). Como consequência, temos um espectro de efeitos que podem variar desde infecções assintomáticas ou subclínicas a lesões tardias de mucosas, até o

envolvimento generalizado do sistema fagocítico mononuclear (Sacks et al. 1993; Pearson & Souza 1996). Em função do amplo espectro da doença, várias formas clínicas estão incluídas no termo leishmanioses, mais notavelmente as leishmanioses cutânea, mucosa e visceral que resultam da replicação dos parasitos no sistema linfomonocitário da derme, da mucosa oronasofaríngea e de forma sistêmica, respectivamente (Herwaldt, 1999). Em todas as formas clínicas, os macrófagos são os principais alvos de replicação intracelular do parasito e a clínica da doença é determinada tanto pela resposta imunoinflamatória do hospedeiro, quanto pela espécie do parasito e a infecção tecidual persistente é característica da leishmaniose (Murray et al., 2005).

A forma cutânea da leishmaniose é a mais comum e representa 50 a 75% dos novos casos registrados. Noventa por cento desses casos cutâneos ocorrem no Afeganistão, Algéria, Brasil, Iran, Perú, Arabia Saudita e Síria (World Health Organization, 1998). As manifestações clínicas, relacionadas a esta forma, são inicialmente a presença de uma pápula eritematosa no local da picada do vetor, que conseqüentemente, aumenta de tamanho levando à ulceração da lesão. As lesões ulceradas apresentam bordas elevadas e bem demarcadas; outra característica destas lesões é a ausência de dor (Masmoudi et al. 2013).

O período de incubação da leishmaniose tegumentar pode variar num período compreendido entre semanas e meses. Apesar da maioria das lesões apresentarem cura espontânea (Masmoudi et al. 2013), as lesões mucocutâneas, uma forma secundária das lesões cutâneas, podem surgir, no período de um a dois anos após o início da infecção. Assim, o tratamento adequado é necessário para evitar a evolução da doença para uma forma mais grave e destrutiva, como a designada forma mucosa (Couto et al. 2014).

1.2. Tratamento

1.2.1. Antimoniais

No início do século passado, mais precisamente em 1912, um pesquisador pioneiro no tratamento da leishmaniose, Gaspar de Oliveira Vianna, observou que o antimônio (III), o tártaro emético, era eficaz na terapêutica da leishmaniose tegumentar americana (Rezende, 2009, Rath, 2003). Depois de alguns anos, foi confirmada, na Itália, a eficácia deste fármaco no tratamento de calazar. Entretanto, devido aos graves efeitos colaterais tóxicos, associados

ao emprego de tártaro emético, este fármaco foi sendo substituído por antimônio pentavalente (V) (Rath, 2003).

Em 1920, Bramachari desenvolveu o primeiro composto à base de antimônio pentavalente, o uréia estibamina, derivado uréico do ácido p-aminofenil estibínico. Em 1936, Schmidt introduziu na terapia médica o gluconato de antimônio (V) sódico, conhecido comercialmente como Pentostam® (Glaxo). Entretanto, foi durante a Segunda Guerra Mundial, que surgiu na França um medicamento alternativo, o antimoniato de N-metil glucamina, comercializado como Glucantime® (Aventis), ou antimoniato de meglumina (Frézard et al., 2009; Rath, 2003). Mas, até hoje pouco se sabe sobre o mecanismo de ação dos antimônios, embora haja indícios de que o antimônio trivalente Sb(III) seja substancialmente mais potente do que o antimônio pentavalente Sb(V) contra fomas promastigotas e amastigotas do parasito. Esses indícios sugerem que o antimônio pentavalente Sb(V) seja uma pró-droga que, quando convertido a antimônio trivalente Sb(III), por uma conversão metabólica hepática e/ou intramacrofágica, transforma-se em droga ativa (Rath, 2003). Após a conversão a antimônio trivalente Sb(III), o mecanismo de ação deste fármaco parece estar baseado na interferência de processos bioenergéticos do parasito, interferindo no processo de β -oxidação dos ácidos graxos e glicólise do parasito, levando a uma depleção dos níveis de ATP intracelulares (Mishra, 2009).

No tratamento atual, ainda são utilizados como fármacos de primeira escolha os antimônios pentavalentes (antimoniato de metilglucamina e o estibogluconato de sódio), além dos fármacos de segunda escolha como; a anfotericina B, mitelfosina, paromomicina e pentamidina.

1.2.2. Anfotericina B

A anfotericina B tem sido usada com maior frequência, desde a década de 60, para o tratamento das leishmanioses, devido a contra-indicação do uso de antimônio para alguns pacientes (Chávez-Fumagalli et al., 2015, Kaur & Rajput, 2014, Croft, et al., 2006). A anfotericina B é um antifúngico, produzido por cultura de actinomicetos *Streptomyces nodosus*, muito utilizada para tratar infecções fúngicas sistêmicas, o seu mecanismo de ação está relacionado com a sua ligação a esteróides da membrana celular dos parasitos, bem como dos fungos. A *Leishmania spp.* contém ergosterol na sua membrana, diferente das células humanas que contém colesterol, assim, a anfotericina B atua por se ligar ao ergosterol,

alterando a permeabilidade celular destes parasitos, levando-os à morte (Chávez-Fumagalli et al., 2015, Kaur & Rajput, 2014, Masmoudi, et al., 2013, Croft, et al., 2006, Rath et al., 2003).

1.2.3. Miltefosina

A miltefosina (hexadecilfosfocolina) é o primeiro fármaco oral testado para o tratamento da leishmaniose cutânea e visceral. Esse medicamento é um antineoplásico que atua no parasito através da interferência em sua membrana celular, modulando a composição lipídica, a permeabilidade, a fluidez da membrana e o metabolismo de fosfolipídeos, o que leva o parasito à morte (Filho et al., 2008). A miltefosina foi registrada na Índia em 2002, para o tratamento da leishmaniose visceral, que consiste em uma dose oral de 2,5 mg/Kg de miltefosina, diariamente por 28 dias. Uma das principais dificuldades da utilização deste medicamento na clínica, principalmente para mulheres em idade fértil, é o seu potencial abortivo e teratogênico, além possuir elevado tempo de eliminação, tempo de meia-vida de aproximadamente 150 horas, e de se acumular no corpo durante o tratamento (Kaur et al., 2015, Masmoudi et al., 2013, Singh et al., 2012).

1.2.4. Paromomicina

A paromomicina, também conhecida como aminosidina, é um antibiótico aminoglicosídeo que demonstrou atividade leishmanicida (Singh et al., 2012, Tiunan et al., 2011, Croft et al., 2006). Devido a má absorção oral, as formulações desenvolvidas para este medicamento, foram a tópica e a intramuscular (Tiunan et al., 2011, Croft et al., 2006). O mecanismo de ação deste fármaco ocorre através da inibição da síntese de proteínas (Singh et al., 2012).

1.2.5. Pentamidina

A pentamidina é outro medicamento utilizado como alternativa para o tratamento das leishmanioses, é utilizada através de injeções intramusculares e comercializada na forma de sais de pentamidina, principalmente isotionato de pentamidina. Com relação ao seu mecanismo de ação, sabe-se que este fármaco interfere no transporte de aminoácidos, competindo com as poliaminas pelos ácidos nucléicos, podendo preferencialmente ligar-se ao DNA do cinetoplasto, causando a morte do parasito (Kaur & Rajput, 2014, Masmoudi et al., 2013, Brum & Hatz, 2009, Croft et al., 2006). Inicialmente, a pentamidina foi utilizada para

tratar pacientes, que não respondiam bem ao tratamento com antimônio, entretanto, com a diminuição da eficácia deste fármaco e com o aumento do risco de resistência a este tratamento, sua utilização na Índia foi suspensa (Singh et al., 2012).

1.3. Contra-indicações e efeitos colaterais

Embora estes fármacos sejam mais promissores dos que os primeiros fármacos, como os antinonios trivalentes, suas desvantagens e contra-indicações devem ser consideradas (Morais-Teixeira et al., 2013, Gazanion et al., 2011, Frézard et al., 2009).

As principais desvantagens relacionadas a estes compostos são: a necessidade da grande maioria ser administrados por via parenteral, diariamente, por no mínimo três semanas, além da necessidade de supervisão médica para a administração do tratamento. Outra desvantagem é que não são fármacos recomendados para tratar mulheres grávidas e, principalmente, por não poderem ser administrados em cardiopatas e nefropatas. Já os efeitos colaterais causados por estes fármacos são, náuseas, vômitos, mialgia, diarreia, dores de cabeça, rash cutâneo, efeitos hepatotóxicos e cardiotoxicos (Gazanion et al., 2011, Blum & Hatz, 2009, Frézard et al., 2009). A sua utilização, de forma não controlada, também pode causar diminuição da suscetibilidade do parasito ao fármaco de primeira escolha (Gazanion et al., 2011, Frézard et al., 2009)

1.4. Novas estratégias de tratamento

Devido às dificuldades encontradas e a inúmeros efeitos colaterais, a pesquisa de medicamentos que possam complementar ou substituir o tratamento atual, são de grande interesse nesta área. Assim, alguns avanços têm sido relatados nos últimos anos para o tratamento da leishmaniose cutânea (Tiuman et al., 2011). Uma estratégia que atualmente tem sido relatada é o tratamento experimental com fármacos incorporados a formulações lipossomais, como a anfotericina B (Tiuman et al., 2011) e o antimônio pentavalente (Frézard et al., 2009).

Entretanto, devido ao alto custo destas preparações e às limitações tecnológicas relacionadas com a sua produção, como o caso da dificuldade de retirada total de solventes orgânicos da formulação com antimônio pentavalente (Tiuman et al., 2011, Frézard et al., 2009), sua utilização ainda é limitada (Morais-Teixeira et al., 2013).

Já a utilização de anfotericina B incorporada a formulações lipossomais tem sido cada vez mais empregada. Atualmente, sua utilização é recomendada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), devido ao seu elevado nível de eficácia e segurança, uma vez que a anfotericina B lipossomal tem reduzida toxicidade e é menos nefrotóxica do que a anfotericina B de formulação convencional (Chávez-Fumagalli et al., 2015). A anfotericina B lipossomal é principalmente utilizada por pacientes que apresentam resistência ao antimônio pentavalente (SB^v) ou por contra-indicação a esse tratamento (Blum & Hatz, 2009).

As formulações lipídicas possuem uma certa dificuldade para a sua produção, contudo a indústria farmacêutica desenvolveu três formulações, contendo anfotericina B: a AmBisome[®], que é uma preparação lipossômica de vesículas unilamelares pequenas, constituídas de fosfatidilcolina hidrogenada de soja, colesterol, diesteroilfosfatidilglicerol (DMPG) e anfotericina B; a Amphocil[®], que é uma dispersão coloidal de anfotericina B em sulfato de coleslerila sódica, formulada em partículas discóides; e a Abelcet[®], que é um complexo lipídico com anfoterina B de estrutura multilamelar, constituído de diesteroilfosfatidilcolina (DMPC) e diesteroilfosfatidilglicerol (DMPG) (Tiunan et al., 2011, Filippin & Souza, 2006).

Apesar da anfotericina B lipossomal ser uma importante alternativa terapêutica, o custo ainda é muito alto, o que dificulta a sua utilização para tratar as diversas formas da leishmaniose (Chávez -Fumagalli et al., 2015, (Tiunan et al., 2011).

Outros fármacos também já foram testados como alternativas terapêuticas para leishmaniose cutânea no Velho Mundo. Outros antifúngicos como o cetoconazol (200-600 mg/dia durante 28 dias), o fluconazol (200 mg/dia durante 6 semanas) e o itraconazol (100-400 mg/dia durante 6-8 semanas), que interferem na biossíntese da membrana celular do parasito, demonstraram eficácia variada segundo os estudos realizados. Além disso, a toxicidade hepática causada por estes fármacos, limita a sua utilização (Masmoudi, et al., 2013).

Outra estratégia discutida, já há algum tempo, é o uso do tratamento tópico utilizando paromomicina. Em estudo publicado por El-On et al., 1986, alguns resultados favoráveis foram observados em pacientes infectados com *Leishmania major* e tratados com uma pomada contendo 15% de paromomicina. Esse tratamento tópico também já foi ensaiado por diversos grupos como Abahusein et al., (1992); Asilian et al., (1995); Soto et al., (1995); Bell et al., (1997); Van Gompel & Vervoot, (1997), apresentando, entretanto, resultados divergentes.

Contudo, no trabalho publicado por Gonçalves et al., 2005, o grupo demonstrou que quando camundongos BALB/c são infectados por *Leishmania amazonensis* e tratados com formulação tópica, contendo 10% de paromomicina, eles apresentaram cicatrização da lesão após 35 dias de tratamento. Entretanto, houve recidiva gradual das lesões no final do experimento e não havia diferença significativa entre o grupo controle e o grupo tratado.

O tratamento tópico utilizando antimônio tem um estudo mais restrito com poucas publicações disponíveis. Um creme a 1% de tártaro emético, embora sem dados muitos precisos, já foi relatado como tratamento favorável em pacientes do estado de São Paulo (Pupo, 1926). Além disso, Costa et al. (1986), estudaram o emprego de Pentostan em pó com a seguinte composição: 15g do pó dissolvido em 20ml de água e 15g de Aquaphor para formar um creme. Esta fórmula foi aplicada na quantidade de 2g (correspondendo a 600mg de Sb^{5+}), duas vezes por dia na superfície da úlcera. No período de 5 a 10 dias, eles obtiveram resultados que variaram desde acentuada melhora, até piora de algumas lesões. Estes mesmos autores apresentaram, em comunicação pessoal, não publicada, de McGreevy, P.B., o bom resultado do creme de Pentostan em lesão causada por *Leishmania (Viannia) panamensis* em roedores. Já el-On et al. (1984), trabalhando em modelo murino de infecção por *Leishmania trópica*, sugerem que antimônio-terapia tópica não seria efetiva neste modelo. Além disso, Romero et al. (1996), fizeram um relato interessante de um paciente da zona endêmica de Corte da Pedra, na Bahia. Este paciente informava que, aos 34 anos de idade, tinha desenvolvido três úlceras cutâneas nos antebraços e que estas lesões haviam sido tratadas com pó de tártaro emético, comprado pelo paciente, sem prescrição médica. As lesões cicatrizaram em 40 dias, deixando cicatrizes típicas de leishmaniose de 15, 18 e 20mm de diâmetro.

1.5. Produtos de origem vegetal

Devido aos diversos efeitos colaterais e dificuldades no tratamento com as principais drogas, tem havido um crescente interesse pela busca de novos agentes com características leishmanicidas que apresentem menos efeitos colaterais (Chan-Bacab & Peña-Rodríguez, 2001, Morale-Yuste et al., 2010).

Com isso, houve um maior desenvolvimento na pesquisa, utilizando produtos naturais, com atividades contra protozoários. Como resultado dessa pesquisa, algumas plantas começaram a ser utilizadas no tratamento de doenças, principalmente cutâneas, como a leishmaniose cutânea (Monzote et al., 2007). O crescente interesse científico em estudar e avaliar plantas utilizadas nas preparações de remédios populares proporcionou à medicina

moderna uma grande variedade de substâncias eficazes, que podem ser utilizadas para o tratamento de doenças causadas por protozoários parasitas (Monzote et al., 2007).

Os produtos de origem vegetal fazem parte da vida do homem desde os primórdios, como fonte de alimentos, de materiais para o vestuário e ainda como meio restaurador da saúde. Contudo, nos dias de hoje, eles representam mais uma alternativa dentre as diversas fontes de insumos necessários à existência da sociedade, tendo como principal vantagem o fato de serem renováveis. Além disso, numerosos produtos de origem vegetal têm sido empregados na medicina popular, como tentativa de controle das mais diversas doenças como, bronquites, pneumonia, úlcera e diarreia (Lima et al., 2006, Schenkel et al., 2004).

Em todo o mundo, o uso de plantas medicinais ainda contribui de forma significativa para os cuidados primários da saúde. No Brasil, um número significativo de plantas tem sido utilizado na forma de extrato bruto, infusões ou emplastos no tratamento de infecções comuns, embora existam poucas evidências científicas comprovando a eficácia dos mesmos. Contudo, a medicina tradicional ainda é amplamente utilizada por pessoas que vivem no interior do país. Sob este aspecto, verifica-se que a fitoterapia vem crescendo no Brasil, ganhando importância econômica devido a sua popularidade como alternativa nos cuidados com a saúde (Lima et al., 2006).

No início do século passado, os produtos de origem vegetal começaram a ser estudados e estabeleceu-se uma tendência para a utilização das substâncias ativas isoladas, os chamados “princípios ativos”. A partir dos anos 80, as dificuldades como o lento desenvolvimento e o alto custo para se chegar aos componentes ativos, devido aos processos trabalhosos para a separação e purificação dos produtos naturais e para a sua elucidação estrutural em busca de novos fármacos, foram sendo ultrapassadas. Através de avanços técnicos significativos, tanto no desenvolvimento de *screening*, como nas técnicas de isolamento e elucidação estrutural, estes novos métodos permitiram, em pouco tempo, avaliar um número elevado de amostras que evidenciam a atividade sobre alvos específicos, enzimas, receptores, determinadas células ou organismo. O desenvolvimento de técnicas cromatográficas e técnicas de elucidação estrutural, particularmente relacionadas com a ressonância magnética nuclear (RMN) e com a espectrometria de massas (EM), também têm sido consideradas capazes de acelerar a obtenção de novos protótipos e tornar mais fácil e rápida as tarefas que condicionavam um lento desenvolvimento dos projetos (Schenkel et al., 2004).

Novas possibilidades analíticas, como a análise de óleos voláteis através da aplicação da cromatografia gasosa acoplada à espectrometria de massas (CG/EM) e ao uso de técnicas

combinadas, como a cromatografia líquida de alta eficiência (CLAE/EM) e (CLAE/RMN), permitiram maior rapidez na busca de novas substâncias ativas e na obtenção de informações preliminares sobre constituintes em amostras complexas. Tais tecnologias têm determinado o ressurgimento do interesse pela investigação de produtos naturais como possíveis fontes de novos protótipos (Schenkel et al., 2004).

Recentes trabalhos publicados com óleos essenciais relatam a sua atividade biológica e/ou de seus compostos majoritários isolados, contra protozoários. Em estudo publicado por Ueda-Nakamura e colaboradores em 2006, foram demonstrados os efeitos do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* contra formas amastigotas e promastigotas de *Leishmania amazonensis*. Os resultados dos experimentos, *in vitro*, demonstraram que parasitos incubados com 100µg/ml desse óleo foram totalmente destruídos. Monzote e colaboradores (2007), também evidenciaram, *in vitro*, a atividade do óleo essencial de *Chenopodium ambrosioides* contra *Leishmania donovani*. Outros trabalhos semelhantes mostram a atividade leishmanicida do óleo essencial de *Artemisia absinthium*, *Echinops kebericho* (Tarikua et al., 2011) e da *Lippia sidoides Cham.* (Medeiros et al., 2011). Tais resultados demonstram que os óleos essenciais, derivados de plantas, representam fontes promissoras de compostos que poderão, futuramente, ser empregados como tratamento alternativo da leishmaniose cutânea. Entretanto, em razão da limitada disponibilidade de medicamentos eficazes, a maioria das pessoas que vivem em áreas onde a doença é endêmica dependem em grande parte de tratamentos realizados pela medicina tradicional e popular (Monzote et al., 2007^b). Com isso, investimentos nesta área tornam-se importantes para o conhecimento e obtenção de matéria-prima, ou para o desenvolvimento de outras classes de substâncias ativas com maior eficácia e menos efeitos colaterais.

1.5.1. (-)- α -bisabolol

Um exemplo dos componentes que estamos discutindo é o (-)- α -bisabolol, um álcool sesquiterpeno encontrado em vários óleos essenciais de diferentes plantas, como no óleo essencial da *Matricaria chamomilla*. Por causa das suas propriedades farmacológicas e de seu odor agradável, esse composto tem sido largamente utilizado pela indústria, em dermatologia e preparações cosméticas (Gomes-Carneiro, et al., 2005).

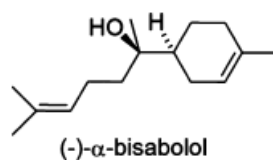


Figura 1.1. Fórmula química estrutural do (-) α -bisabolol (Corpas-López et al. 2015).

Já o chá da *Matricaria chamomilla*, popularmente conhecida como camomila, é utilizado em vários países como hábito alimentar. Entretanto, as suas propriedades medicinais somente começaram a ser elucidadas há trinta anos (Bezerra, 2009). Em países europeus, o chá de camomila é amplamente empregado na medicina popular no tratamento de doenças inflamatórias, febres, diarreias e por suas propriedades sedativas. Muitas propriedades medicinais desta planta são atribuídas ao seu óleo essencial. O óleo de camomila possui um alto teor de bisabolol que possui diversas atividades farmacológicas como ação antiinflamatória, analgésica e bactericida (Corpas-López et al., 2015; Hojati et al., 2010; Gomes-Carneiro et al., 2005).

Já as características químicas do α -bisabolol podem levar a alterações na permeabilidade e integridade da membrana celular de diferentes patógenos, devido a sua característica lipofílica que facilita a penetração de substâncias ativas na bicamada lipídica da membrana celular (Morale-Yuste et al., 2010; Sikkema et al., 1995). Estudos recentes demonstraram a atividade leishmanicida do α -bisabolol contra promastigotas de *Leishmania infantum* em experimentos *in vitro* (Morale-Yuste et al., 2010). Além disso, segundo Kadir e Barry (1991), o α -bisabolol é capaz de aumentar *in vitro* a penetração de drogas transepidermal. Estes achados corroboram com os resultados encontrados por Brehm-Stecher e Jonson (2003), onde este sesquiterpeno apresentou atividade contra uma grande variedade de agentes patogênicos, demonstrando que baixas concentrações de α -bisabolol foram capazes de aumentar a permeabilidade de células bacterianas para certos compostos químicos exógenos, incluindo compostos antimicrobianos.

Essa propriedade do α -bisabolol pode ser importante para aumentar a suscetibilidade de alguns patógenos, como a *Leishmania*. Em estudo *in vitro* realizado pelo nosso grupo foi possível demonstrar, através de ensaios leishmanicidas e análise por microscopia eletrônica de transmissão (MET), que o (-) α -bisabolol possui atividade contra *L. amazonensis*. As análises realizadas por MET em formas promastigotas tratadas com (-) α -bisabolol identificaram mudanças estruturais provocadas nos parasitos e as primeiras organelas afetadas por este óleo. Foi possível observar diversas alterações causadas pelo (-) α -bisabolol nestes parasitos, de

forma crescente durante o tempo de tratamento. Dentre as principais alterações, podemos destacar: aumento do volume da mitocôndria, presença de estruturas eletrondensas, desorganização celular com aumento de inclusões lipídicas no citoplasma, presença de vesículas na bolsa flagelar, descontinuidade da membrana nuclear, dano no cinetoplasto, condensação da cromatina, membrana plasmática com descolamento da bicamada lipídica, perda da organização dos microtúbulos e perda das organelas citoplasmáticas com presença de projeções na mesma (Rottini et al., 2015). Outro resultado importante, obtido neste estudo, foi a confirmação da atividade leishmanicida intracelular. Demonstramos que o (-)- α -bisabolol é capaz de atravessar a membrana celular e destruir as formas amastigotas intracelulares, sem causar qualquer dano nas células hospedeiras J774.G8. Além disso, também observamos o comprometimento do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), que pode ser avaliado utilizando o corante tetrametilrodamina, etil éster (TMRE), que se acumula em células viáveis, evidenciando a existência de alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial. Foi possível demonstrar que 69,06% dos parasitos, formas promastigotas, quando tratados com 8.07 $\mu\text{g/ml}$ de (-)- α -bisabolol apresentaram mudança no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), o que levou os parasitos à morte (Rottini et al., 2015).

Esta capacidade de atravessar a membrana de promastigotas e amastigotas é encontrada em componentes altamente lipofílicos, tais como os compostos derivados de plantas. Esse atributo pode contribuir para a atividade tóxica destes compostos que, ao atravessarem a membrana celular, podem levar à perda de impermeabilidade de certos compostos, tais como eletrólitos intrínsecos, causando a morte celular (Medeiros et al., 2011).

Além da capacidade de aumentar a permeabilidade celular, segundo Morales-Yuste, et al, (2010) e Wink (2008), outra característica que explicaria a ação leishmanicida eficiente do α -bisabolol seria a presença do grupo hidroxila neste composto.

Em estudo recente, Corpas-López e colaboradores em 2015, avaliaram a atividade leishmanicida do (-)- α -bisabolol, em tratamento oral, contra leishmaniose visceral. A pesquisa, inicialmente, avaliou a atividade leishmanicida intracelular, desse álcool sesquiterpeno, contra *L. infantum*. O resultado obtido, neste ensaio, demonstrou uma redução de 85% de formas amastigotas intracelulares de *L. infantum* quando as células infectadas eram tratadas com (-)- α -bisabolol. Já o ensaio *in vivo* utilizou camundongos Balb/c, infectados, por via intraperitoneal, com 10^7 formas promastigotas de *L. infantum*. O tratamento oral, com duração de 14 dias, foi iniciado após 28 dias de infecção e, a seguir, foram realizados os procedimentos de necrópsia para avaliação da atividade leishmanicida. Uma das técnicas utilizadas neste procedimento foi a quantificação da carga parasitária utilizando o qPCR, ensaio que foi realizado com o fígado

e o baço dos animais tratados, comparando-os com animais do grupo controle. Os resultados obtidos, por esse grupo de pesquisa foram significativos na medida em que houve uma redução da carga parasitária do baço e do fígado de 71,6% e 89,2%, respectivamente, no momento em que os animais foram tratados com 200 mg/Kg/dia de (-)- α -bisabolol. Corpas-López et al., (2015) acreditam que o (-)- α -bisabolol possa vir a ser um composto promissor no tratamento da leishmaniose.

Assim, a pesquisa de agentes leishmanicidas de baixa toxicidade, alta eficácia e fácil administração é um desafio que tem envolvido diversos grupos de pesquisa (Miot et al., 2005). Portanto, esse tratamento tópico utilizando (-)- α -bisabolol se justifica, pois se trata de uma formulação que pode ser facilmente aplicável pelo próprio paciente em sua residência, possui baixo custo e não apresenta efeitos colaterais como os induzidos pelo tratamento atual. Outra vantagem seria sua utilização em pacientes com contra indicação ao tratamento atual, como: cardiopatas, nefropatas, mulheres grávidas; além de poder ser utilizado em animais, os quais não podem fazer uso do tratamento atual disponível, devido ao risco de indução à seleção de cepas resistentes aos medicamentos disponíveis para o tratamento das leishmanioses em seres humanos, segundo a Portaria Interministerial N^o 1.426, de 11 de julho de 2008.

Desta forma, acreditamos que a produção e avaliação de uma formulação tópica, contendo (-)- α -bisabolol será de grande valor por permitir um tratamento sem a necessidade diária de supervisão e que, além de ser seguro, eficaz, de fácil aplicabilidade, não apresenta toxicidade.

2. Objetivos

2. Objetivo geral:

Produzir uma formulação tópica em forma de creme à base de (-) α -bisabolol e avaliar sua eficácia no tratamento de lesões cutâneas de leishmaniose tegumentar em modelo murino.

2.1. Objetivos Específicos:

Identificar os possíveis mecanismos de ação do (-) α -bisabolol *in vitro* contra as formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis*;

Produzir as formulações tópicas à base de (-) α -bisabolol;

Verificar as possíveis alterações hematológicas e bioquímicas que possam ser causadas pelo tratamento com as formulações tópicas à base de (-) α -bisabolol;

Verificar a eficácia da formulação tópica à base de (-) α -bisabolol através da determinação da carga parasitária, após o tratamento, pela técnica de PCR em tempo real, no local da inoculação do parasito;

Verificar a eficácia da formulação tópica através da avaliação histopatológica da pele na região da cicatriz, deixada pela lesão causada pela *L. amazonensis*, e avaliação da reparação da matriz extracelular da área lesionada.

3. Materiais e Métodos

3.1. (-) α -bisabolol

O (-) α -bisabolol foi obtido comercialmente (Sigma, USA), apresentando através da cromatografia gasosa (CG) 95% de pureza.

3.2. Creme Lanette

O creme Lanette é uma emulsão O/A, de característica branco viscoso com caráter aniônico, sendo facilmente absorvido pela pele, além de ser compatível com óleos e extratos vegetais. Foi obtido comercialmente de farmácia de manipulação.

3.3. Ensaios *in vitro*

Inicialmente, para identificar e confirmar os possíveis mecanismos de ação do (-) α -bisabolol, *in vitro*, foram realizados dois experimentos que permitiram sugerir o mecanismo de ação do (-) α -bisabolol *in vivo*. Para isso, utilizamos o (-) α -bisabolol, diluído em meio de cultura Schneider's (Sigma, USA), em uma concentração de 8,07 μ g/ml, concentração capaz de inibir 50% do número de parasitos, *in vitro*, IC₅₀, já determinado em ensaios anteriores.

3.3.1. Microscopia eletrônica de transmissão

A técnica de microscopia eletrônica de transmissão foi empregada para avaliar possíveis alterações ultraestruturais presentes em formas promastigotas e amastigotas intracelulares e determinar as primeiras organelas afetadas pelo (-) α -bisabolol. Formas promastigotas de *L. amazonensis* foram tratadas com 8,07 μ g/ml (-) α -bisabolol, diluído em meio de cultura Schneider's (Sigma, USA), por diferentes tempos (2, 4, 8, 16 e 24 horas). Como controle, foram utilizados parasitos não tratados. Após o tratamento, os parasitos foram fixados com 2,5% de glutaraldeído (Sigma, USA) em solução tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2 *overnight*. Em seguida, foram lavados três vezes com tampão cacodilato 0,1M e pós-fixados com tetróxido de ósmio 1%, ferricianeto de potássio 0,8% e 5mM de cloreto de cálcio em tampão cacodilato 0,1M por 30 min. Os parasitos pós-fixados foram desidratados em acetona e emblocadas em resina epon. Cortes ultrafinos foram obtidos em ultramicrotomo contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados em microscópio de transmissão eletrônica Jeol JEM 1011 (JEOL, Japan) (Duarte et al. 1992).

As análises de microscopia eletrônica de transmissão em formas amastigotas intracelulares foram realizadas através da infecção de células de linhagem contínua J774.G8. As células foram cultivadas em uma concentração de 10^5 células por garrafa em meio de cultura DMEM (Dubelcco's modified Eagle's médium, Sigma, USA), 5% de soro fetal bovino (SFB; Sigma F3018), penicilina (10.000U/mL) e estreptomicina (10.000 μ g/mL). por 24 horas em estufa a 37 °C com 5% de CO₂. Após 24 horas as células foram infectadas com formas promastigotas de *L. amazonensis*. Para isso, foi utilizado um número de parasitos 10 vezes maior do que o número de células. Vinte e quatro horas após a infecção, as culturas foram lavadas três vezes com PBS, para retirada dos parasitos que permaneciam no meio extracelular. Em seguida foram incubadas com o (-) α -bisabolol na concentração de 8.07 μ g/mL por 24 horas. Como controles, foram utilizadas culturas com células não infectadas, porém tratadas com o (-) α -bisabolol, culturas com células infectadas (sem tratamento) e culturas somente com células (sem infecção e sem tratamento). Após este período, as células foram processadas conforme descrito para as formas promastigotas.

3.3.2. Citometria de fluxo de formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*

Para investigar a possível capacidade do (-) α -bisabolol de atravessar a membrana da mitocôndria e causar mudança no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$), formas promastigotas de *L. amazonensis* (1×10^6 parasitos) foram incubadas durante 24 horas, a 26 °C, com 8,07 μ g/ ml de (-) α -bisabolol (tratado). Após este período, os parasitos foram incubados com 50 nM de tetrametilrodamina, etil éster (TMRE) (Molecular Probes, Carlsbad, EUA), durante 15 min, à temperatura ambiente. Após este procedimento, as amostras foram colocadas em gelo e imediatamente analisadas por citometria de fluxo. Os mesmos procedimentos foram realizados em parasitos não tratados, que funcionaram como controle.

As amostras foram analisadas num citômetro de fluxo FACSCalibur (Becton Dickinson, CA, EUA). A fluorescência resultante do TMRE foi medida no canal FL2 e o software utilizado para a aquisição e análise de dados foi o Summit v4.3. Um total de 10.000 eventos foi adquirido na região previamente estabelecida como a dos parasitos.

3.4. Ensaio *in vivo*

3.4.1. Animais

Foram utilizados camundongos BALB/c, machos, com 4 a 6 semanas de idade e pesando de 20 a 30 gramas, fornecidos pelo CECAL – FIOCRUZ, RJ. Os animais foram mantidos no biotério de experimentação do Pavilhão Hélio e Peggy Pereira – HPP sob temperatura controlada, alimentação com ração apropriada e água filtrada *ad libitum*. Todos os procedimentos com os animais foram previamente aprovados pela Comissão de Ética de Uso de Animais de Laboratório da FIOCRUZ (CEUA-FIOCRUZ) sob o número de licença LW 72/12.

3.5. Formulações tópicas

A base utilizada para a produção da formulação foi o creme Lanette e como princípio ativo o (-)- α -bisabolol, ambos obtidos comercialmente. Foram produzidas três formulações com diferentes concentrações de (-)- α -bisabolol. A primeira correspondia à concentração de 1.000 mg/kg/dia, a segunda a 500 mg/kg/dia e a terceira a 250 mg/kg/dia, levando em consideração o peso dos animais. As formulações foram mantidas em geladeira e possuíam duração de uma semana.

3.5.1. Testes de estabilidade do creme

As amostras foram submetidas ao teste de estabilidade preliminar/acelerada a temperatura de 50 °C. Uma amostra de cada formulação foi retirada e avaliada nos tempos de zero, cinco, sete e dez dias. Foram avaliadas as características organolépticas e efeito da centrifugação, especificados nos itens a seguir:

3.5.2. Características organolépticas

As preparações tópicas foram analisadas segundo descrito no Guia de Controle de Qualidade de Produtos Comésticos (Anvisa, 2008). Para verificação das características macroscópicas das formulações, foram homogeneizadas pequenas quantidades das amostras em recipientes transparentes e foram observadas contra um fundo branco, para observar possíveis alterações como: a presença ou não de resíduos, precipitação, turvação e separação de fases. Para a determinação da cor, os produtos foram avaliados por identificação visual; e para o odor foi utilizado o olfato como sentido (Anvisa, 2008).

3.5.3. Teste de centrífuga

Para novamente avaliar a estabilidade das formulações, foi realizado o teste de centrífuga, que produz estresse na amostra, semelhante ao que ocorre com o aumento na força de gravidade. Esse teste aumenta a mobilidade das partículas e antecipa possíveis instabilidades, que poderiam ser observadas na forma de precipitação das amostras, separação de fases e formação de sedimento compacto.

Para a realização deste teste foi retirada uma pequena amostra das formulações tópicas que foram colocadas em tubos e estes encaminhados à centrífuga (Jouan, 1995/3777a), a uma velocidade de 1.500g durante um período de 30 minutos (Anvisa, 2008).

3.6. Infecção experimental

Os animais foram infectados com 10^4 amastigotas de cepa MHOM/B7/76/Ma-5 de *L. amazonensis* por via intradérmica na base da cauda. Os parasitos foram obtidos de uma lesão nodular não ulcerada de camundongos BALB/c e purificados após ruptura do tecido infectado em um homogeneizador Potter-Elvehjeng com pistilo em tampão PBS. A suspensão foi filtrada em gaze e a viabilidade dos parasitos foi avaliada usando o corante eritrosina B conforme técnica descrita (Hodgkinson, 1980).

Depois da infecção, os animais foram mantidos em condições apropriadas no biotério e, após seis semanas, todos os animais infectados apresentavam edema no local da inoculação e lesões ulceradas.

3.7. Ensaio terapêutico com a formulação tópica

O tratamento foi realizado uma vez ao dia, durante 30 dias consecutivos, com aplicação das formulações sobre a área do inóculo de parasitos. Antes de iniciar o tratamento, após seis semanas de infecção, os animais foram distribuídos em grupos de forma aleatória, para haver semelhança entre as lesões nos diferentes grupos. O experimento foi realizado com 8 grupos contendo 15 animais em cada grupo. Antes de cada aplicação da formulação tópica foi realizada limpeza da área de pele lesionada com água destilada. Foram utilizadas três formulações com diferentes concentrações de (-)- α -bisabolol, sendo a primeira formulação com 1.000 mg/kg/dia; a segunda com 500 mg/kg/dia e a terceira com 250 mg/kg/dia, seguindo como parâmetro o Guia para a condução de estudos não clínicos de toxicologia e

segurança farmacológica necessários ao desenvolvimento de medicamentos (Anvisa). Obedecemos ao seguinte esquema de tratamento: grupo B1.000- animais infectados que receberam o creme com 1.000 mg/kg/dia de (-) α -bisabolol; grupo B500- animais infectados que receberam o creme com 500 mg/kg/dia de (-) α -bisabolol; grupo B250- animais infectados que receberam o creme com 250 mg/kg/dia de (-) α -bisabolol; grupo BASE- animais infectados que receberam somente a base (sem princípio ativo); grupo Glu (Glucantime)-animais infectados, que receberam 20mg/kg/dia de Glucantime[®] por via intramuscular; os animais do grupo CTRL/INF (controle/infectado), grupo controle da infecção, foram infectados e não tratados; os animais do grupo NI (não infectado/B1.000 receberam apenas o tratamento com a formulação com 1.000 mg/kg/dia de (-) α -bisabolol, e não foram infectados e o grupo NI/NT (não infectado/não tratado), grupo controle da infecção e do tratamento foi composto de animais sem infecção e sem tratamento.

3.8. Parâmetros avaliados

3.8.1. Mortalidade

O percentual de mortalidade dos animais foi avaliado para verificar o grau de toxicidade do tratamento *in vivo*. Assim, o número de sobreviventes foi acompanhado diariamente até a finalização dos protocolos.

3.8.2. Avaliação clínica

Foram avaliados também os parâmetros comportamentais e o peso corporal dos animais, para verificar o grau de toxicidade do tratamento. Mudanças comportamentais foram avaliadas através de observação do comportamento dos animais e o peso corporal dos animais foi aferido, em dias alternados, durante os 30 dias de tratamento.

3.8.3. Cinética da lesão

Com o objetivo de avaliar a progressão das lesões, após a infecção e/ou tratamento, as caudas dos animais foram medidas periodicamente, de três em três dias, antes e durante o tratamento, e a espessura da área de lesão foi mensurada usando um paquímetro

(Schnelltaster, H.C. Kröplin, GMBH, Hessen, Germany). A cinética da lesão foi expressa pelas médias da espessura (em mm) de três animais de cada grupo.

3.8.4. Coleta de sangue

Para avaliar as possíveis alterações hematológicas, hepáticas e renais que poderiam ter sido causadas pelo tratatamento tópico, utilizando o creme com (-)- α -bisabolol, três animais de cada grupo foram eutanasiados em câmara com atmosfera rica em CO₂ e o sangue destes animais foi coletado por punção cardíaca. Foram coletadas duas alíquotas de sangue de aproximadamente 500 μ L cada. A alíquota de sangue que foi coletada para a avaliação hematológica, foi armazenada em tubo contendo EDTA. Para a avaliação das funções hepáticas e renais dos animais, outra alíquota de sangue foi colocada em tubo contendo gel separador. O procedimento de coleta foi realizado em tempos diferentes, para comparação dos efeitos agudos e crônicos do tratamento com o (-)- α -bisabolol. A primeira coleta foi realizada com 6 horas, e o segundo ponto após 24 horas do início do tratamento, o que caracteriza a fase aguda. Já para caracterizar a fase crônica, os tempos de coleta foram: 7, 14 e 30 dias após o início do tratamento.

3.8.4.1. Avaliação hematológica

A alíquota de sangue coletada com EDTA foi homogeneizada e, imediatamente após a coleta, processada em contador hematológico (Sysmex Automated Hematology Analyzer), no Centro de criação de animais de laboratório – CECAL/FIOCRUZ, que forneceu os padrões eritrocitários, plaquetários e leucocitários no sangue dos camundongos avaliados.

3.8.4.2. Avaliação bioquímica

A alíquota de sangue coletada para análise bioquímica foi colocada em tubo contendo gel separador e, em seguida, centrifugada a 1.500 rpm imediatamente após a coleta. O soro separado e armazenado hermeticamente a -20° C foi analisado através de sistema automatizado (Ortho Clinical Diagnostics – Johnson & Johnson), utilizando kits comerciais específicos (Ortho Clinical Diagnostics) para a dosagem de uréia, albumina, creatinina, bilirrubina, TGO, TGP e proteínas totais. A leitura das reações foi realizada em

espectrofotômetro, obedecendo ao comprimento de onda específico para cada teste, de acordo com as recomendações do fabricante.

3.8.5. Preparação dos tecidos para análise histológica

A avaliação histológica foi realizada para observar e comparar os tecidos de animais normais, infectados e infectados e tratados, com o intuito de identificar possíveis alterações resultantes da doença e/ou do tratamento. Para tanto, os animais foram eutanasiados com 6h e 24h (caracterizando a fase aguda), e após 7 dias, 14 dias e 30 dias (caracterizando a fase crônica), após o início do tratamento. As áreas de pele infectadas e/ou tratadas foram retiradas e processadas para análise histológica. Após serem removidos, os tecidos foram fixados em Paraformaldeído a 4% em tampão PBS 0,01 M, pH 7,45 a 4°C por 72 horas e incluídos em parafina para obtenção de cortes de 5µm de espessura. Os cortes foram então corados pelas técnicas de hematoxilina-eosina, Giemsa e Picrosirius Red e analisados em microscópio de luz.

3.8.5.1. Técnica de Hematoxilina-eosina

Os cortes foram desparafinados em três banhos de xilol, hidratados em concentrações decrescentes de etanol até a água destilada e corados durante 8 min na hematoxilina de Harris pré-filtrada (2,5g de hematoxilina – Sigma, USA foi dissolvida em 25mL de álcool absoluto e 50g de alúmen de amônio foi dissolvido em 500mL de água destilada pré-aquecida. As duas soluções foram misturadas e aquecidas até ocorrer a fervura, então, a solução foi retirada do fogo e acrescida de 1,25g de óxido vermelho de mercúrio, que retornou ao aquecimento até apresentar uma coloração vermelha escura. Após, aproximadamente, um minuto a solução foi imediatamente resfriada, através da imersão do frasco em água fria. Foi então acrescido 20mL de ácido acético glacial). Os cortes foram lavados e azurecidos em água corrente, e corados por 2min em solução alcoólica de eosina (5g de eosina Y hidrossolúvel - Merck dissolvidas em 100mL de água destilada acrescida de 900mL de álcool etílico absoluto). Os cortes foram desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e montados entre lâmina e lamínula com Entellan (Merck).

3.8.5.2. Técnica de Picrosirius Red

Os cortes foram desparafinados em três banhos de xilol, hidratados em concentrações decrescentes de etanol até a água destilada. Em seguida foram colocados *over-night* em solução de Picrosirius Red (0,1g de Sirius Red F3B200 - Sigma foi dissolvido em 100mL de solução aquosa saturada de ácido pícrico). No dia seguinte os cortes foram lavados rapidamente em água destilada, corados por 15min na hematoxilina de Harris, lavados e azurecidos em água corrente durante 10min, desidratados em concentrações crescentes de etanol, diafanizados em xilol e montados entre lâmina e lamínula com Entellan® (Merck).

3.8.5.3. Técnica de Giemsa de Lennert

Os cortes foram desparafinados em três banhos de xilol, hidratados em concentrações decrescentes de etanol até o álcool 90% e corados durante 2 horas em solução pré-filtrada de Giemsa (3,80g de Giemsa, SIGMA foi diluído em álcool metílico e glicerina, que foram acrescentados em pequenas porções durante um período de 15 minutos. A solução foi transferida para um frasco, tampada e deixando descansar por 24 horas, agitando ocasionalmente). Os cortes foram colocados em solução de ácido acético 0.5% para a diferenciação, e depois em álcool etílico 95%, observando a coloração em microscópio e, finalmente, desidratados em álcool isopropílico, diafanizados em xilol e montados entre lâmina e lamínula com Entellan® (Merck, USA).

3.8.6. Reação em cadeia pela Polimerase - PCR em Tempo-Real (qPCR)

3.8.6.1. Extração de DNA dos tecidos

Para verificar a presença e quantificar o DNA do parasito no sítio de infecção dos animais, uma parte desses fragmentos de tecidos, obtidos nos momentos da necropsia, antes da fixação para histologia, foi reservada e armazenada em freezer -70 °C até o processamento para a técnica de PCR. Amostras de tecido da cauda, de três animais de cada grupo, foram armazenadas em microtubos do tipo “Eppendorf” e submetidas ao processo de extração para a detecção de DNA parasitário. O DNA genômico foi isolado dos tecidos através da adição de 500µl de tampão de lise (10 mM NaCl, 5 mM M EDTA, 50 mM Tris-HCL (pH 8.0), 0.5%

SDS (sodium dodecyl sulfate) acrescidos de 5µl de proteinase K a 20 mg/mL e incubados por 12 horas a 56 °C – Thermostat 5320 – Eppendorf). Após esse período, 500µl de fenol foram acrescentados em cada amostra e a suspensão homogeneizada em Vortex (Phoenix – A56) e centrifugada (Jouan totor AB 2.14) a 18.410g durante 15 minutos a 4 °C. Os sobrenadantes foram recuperados e transferidos para novos tubos e acrescentando, ao volume, 500µl de clorofórmio/álcool isoamílico (v/v). Após a agitação durante 30 segundos por inversão e nova centrifugação a 18.410g por 15 minutos a 4 °C, os sobrenadantes foram, novamente, recuperados e transferidos para novos tubos. Nesta próxima etapa, 1 mL de etanol absoluto foi acrescentado ao conteúdo de cada tubo e, a seguir, agitando durante 30 segundos por inversão e novamente centrifugado a 18.410g por 15 minutos. Finalmente, os sobrenadantes foram descartados e os sedimentos foram deixados à temperatura ambiente até a total evaporação do etanol. Em seguida, os sedimentos foram ressuspensos em 100µl de água livre de DNA e armazenados a -20 °C até o momento da quantificação de DNA genômico, que foi realizado em espectrofotômetro (NanoDrop® 2000 – Thermo Scientific).

3.8.6.2. Amplificação dos fragmentos

A técnica de PCR foi aplicada ao DNA extraído dos tecidos mencionados no item anterior, a fim de identificar a presença de DNA parasitário dos mesmos. Para tanto, foi efetuada qPCR nas seguintes condições de ciclagem: desnaturação inicial 95°C/10 min, seguida por 40 ciclos de 95°C/15 s, 60°C/50 s e 72°C/30 s. A reação foi composta por SYBR Green Master Mix e analisada no Applied Biosystems Step One Plus™ (USA). Como controle das reações foi utilizado o endogene de camundongo a β -actina – *forward* AGAGGGAAATCGTGCGGTGAC e *reverse* – CAATAGTGATGACCTGGCCGT. O primer utilizado para detecção do parasito foi o kDNA1 – *forward* GGGTAGGGGCGTTCTGC e *reverse* – TACACCAACCCCCAGTTTGC. A análise, a interpretação e o registro dos resultados foram efetuados com o auxílio do software StepOne Software v2.3 (Applied Biosystems).

3.8.7. Análises estatísticas

Os dados foram analisados utilizando o software GraphPad Prism 5.0 (GraphPad Software Inc.). As diferenças entre grupos foram avaliadas através do teste ANOVA.

3.8.8. Critério de cura

Para avaliação de cura dos animais utilizamos critérios morfológicos, moleculares e clínicos. Serão considerados curados os camundongos que apresentarem diminuição da carga parasitária na cicatriz cutânea no local da lesão, associado à diminuição do processo inflamatório, reparação da matriz extracelular local e ausência de sinais e sintomas.

4. Resultados

4.1. Experimentos *in vitro*

4.1.1. Microscopia eletrônica de transmissão (MET)

A análise por MET das formas promastigotas de *L. amazonensis* não tratadas mostrou o parasito com a morfologia nuclear, característica normal e com organelas citoplasmáticas preservadas (Fig. 4.1A). Por outro lado, os parasitos tratados com 8.07µg/mL de (-)α-bisabolol apresentaram, nos diferentes tempos analisados, alterações estruturais significativas. Foi possível observar desorganização celular com aumento de inclusões lipídicas no citoplasma, presença de membranas eletrondensas, aumento de tamanho da mitocôndria, alteração do cinetoplasto e alteração na membrana plasmática com descolamento da bicamada lipídica (Fig. 4.1B, 4.1C, 4.1D, 4.1E, 4.1F, 4.1G).

A fim de verificar a ação do (-)α-bisabolol em formas amastigotas internalizadas realizou-se as análises por MET de células de macrófago J774.G8 infectadas com *L. amazonensis*, e tratadas com 8.07µg/mL de (-)α-bisabolol. Como controle, foram utilizadas células não infectadas e tratadas com o (-)α-bisabolol, células infectadas e não tratadas e células normais não tratadas e não infectadas.

As análises ultraestruturais dos macrófagos normais não infectados e não tratados mostraram as células com estrutura morfológica sem alterações e membranas citoplasmáticas preservadas (Fig. 4.2A), apresentando seu citoesqueleto uniformemente distribuído.

As células não infectadas e tratadas com o (-)α-bisabolol não sofreram efeitos citotóxicos, apresentando assim, morfologia normal, como pode ser observado na figura (Fig. 4.2B).

As células infectados e não tratadas, após 24 horas de infecção, mostraram o parasito internalizado e preservado, com estrutura normal. Observou-se ainda a carioteca bem definida e a presença do cinetoplasto integro (Fig 4.2C).

Entretanto, a análise das células infectadas e tratadas com o (-)α-bisabolol (Fig. 4.2D) mostrou alterações ultraestruturais nas formas amastigotas com a presença de vacúolos em seu citoplasma e destruição da mitocôndria, sem alteração, no entanto, da morfologia da célula hospedeira.

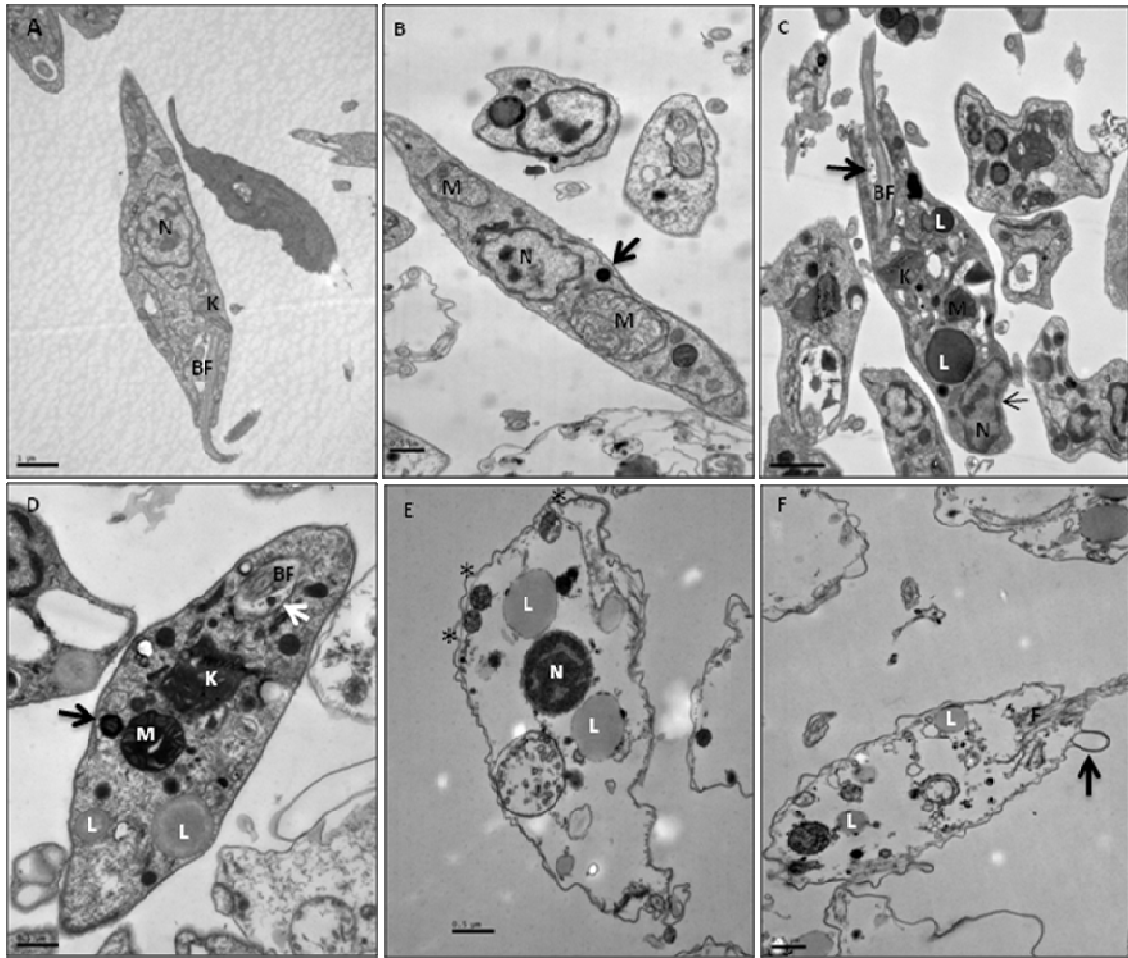


Fig. 4.1 - Microscopia eletrônica de transmissão de formas promastigotas de *L. amazonensis*. (A) Formas promastigotas não tratadas observam-se estruturas do núcleo (N), cinetoplasto (K) e bolsa flagelar (BF) bem preservadas; (B) Formas promastigotas incubadas com (-)- α -bisabolol por 2 horas a 26 °C observa-se aumento do volume da mitocôndria (M), presença de estruturas eletrondensa (seta larga); (C) Formas promastigotas incubadas com (-)- α -bisabolol por 4 horas a 26 °C observa-se desorganização celular com aumento de inclusões lipídicas (L) no citoplasma e presença de vesículas na bolsa flagelar (BF) (seta larga) e descontinuidade da membrana nuclear (seta); (D) Formas promastigotas incubadas com (-)- α -bisabolol por 8 horas a 26 °C observa-se desorganização celular com aumento de inclusões lipídicas no citoplasma, dilatação mitocondrial (M), dano no cinetoplasto (K) e presença de vesículas na bolsa flagelar (BF) (seta branca); (E) Formas promastigotas incubadas com (-)- α -bisabolol por 16 horas a 26 °C observa-se aumento das inclusões lipídicas, condensação da cromatina, membrana plasmática com descolamento da bicamada lipídica (asterisco), perda da organização dos microtúbulos e perda das organelas citoplasmáticas; (F) Formas promastigotas incubadas com (-)- α -bisabolol por 24 horas a 26 °C observa-se destruição da membrana plasmática com presença de projeções na mesma (seta) e perda de organelas citoplasmáticas. Barra = 0,5 μ m (Rottini et al.,2015).

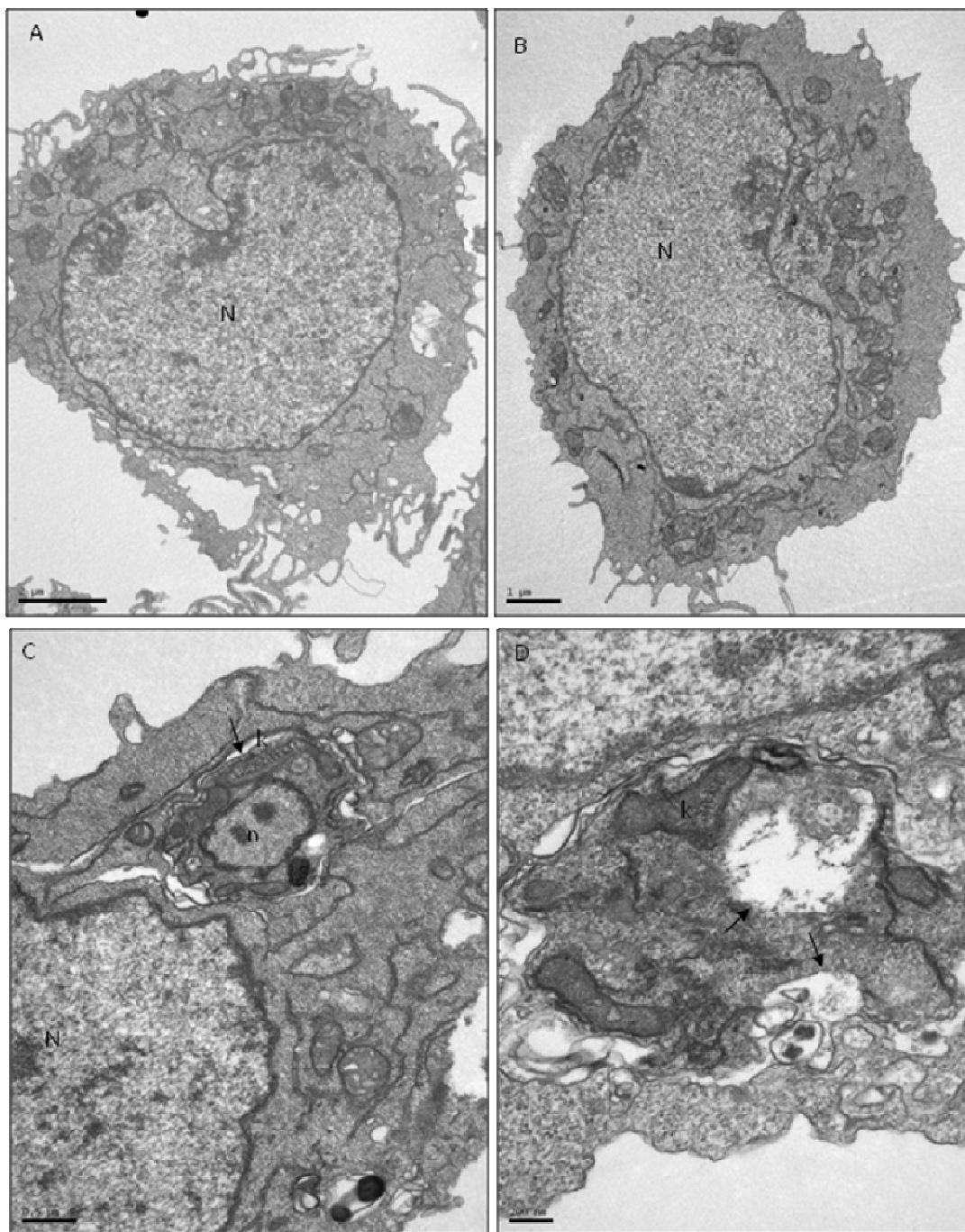


Fig. 4.2 – Microscopia eletrônica de transmissão de macrófagos da linhagem J774.G8. (A) célula não infectada e não tratada apresentando morfologia normal, com estruturas bem preservadas (Barra = 2 μ m), (B) Célula não infectada e tratada por 24 horas com 8.07 μ g/mL de (-) α -bisabolol, apresentando morfologia normal após o tratamento (Barra = 1 μ m), (C) macrófagos de linhagem J774.G8, infectados com *L. amazonensis*, após 24 horas de infecção, observamos formas amastigotas internalizadas apresentando estrutura normal e bem preservada com o cinetoplasto íntegro (setas). As células apresentam ainda suas estruturas citoplasmáticas uniformes e preservadas (Barra = 0,5 μ m); (D) células infectadas e tratadas com (-) α -bisabolol. As setas mostram a presença de

vacúolos no citoplasma das formas amastigotas, demonstrando dano ao parasito (Barra = 0,5 μ m) (Rottini et al.,2015).

4.2. Citometria de fluxo para análise das formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*

Os resultados de citometria de fluxo mostraram uma mudança significativa no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de 69,06% dos parasitos quando tratados com 8.07 μ g/ml de (-)- α -bisabolol - IC₅₀ de formas promastigotas, resultados obtidos anteriormente - (Rottini et al.,2015), enquanto nas formas promastigotas não tratadas essa mudança no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) foi de 17,68% (Fig. 4.3).

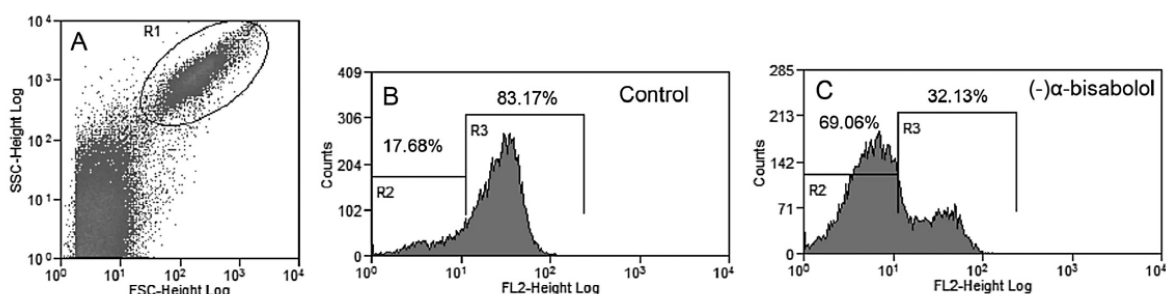


Fig. 4.3 – Resultados da citometria de fluxo de *Leishmania amazonensis* incubadas com TMRE. (A) Formas promastigotas capturadas na região do Gated; (B) Formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, mantidas em meio de cultura por 24 horas e incubadas com TMRE. Em (R3) é possível observar que 83,17% das mitocôndrias apresentavam potencial de mitocôndria preservado; em (R2) é possível observar mudança no potencial mitocondrial de 17,68; (C) Formas promastigotas de *L. amazonensis*, tratadas com 8.07 μ g/ml de (-)- α -bisabolol por 24 horas e incubadas com TMRE; em (R3) é possível observar que 32,13% das mitocôndrias apresentavam potencial de mitocôndria preservado, entretanto, em (R2) é possível observar que 69,06% dos parasitos tratados apresentavam mudança no potencial mitocondrial (Rottini et al.,2015).

4.3. Testes de estabilidade dos cremes

Com a finalidade de manter um controle de qualidade das formulações uma amostra de cada formulação foi retirada e avaliada, utilizando os ensaios analíticos descritos abaixo, nos tempos de zero, cinco, sete e dez dias após a produção. As

amostras foram submetidas ao teste de estabilidade preliminar/acelerada a temperatura de 50 °C.

4.3.2. Características organolépticas

Uma parte da amostra foi retirada para realização de ensaios organolépticos, através da análise do: aspecto, cor, odor e tato. Esse procedimento permite avaliar, de imediato, o estado da amostra em estudo por meio de análises comparativas. Neste teste não foi observada nenhuma variação das formulações testadas em nenhum dos quatro tempos.

4.3.3. Teste de centrifuga

Outra parte da amostra foi retirada e submetida à centrifugação, produzindo estresse na amostra. Neste ensaio também não foram observadas alterações em nenhuma das formulações testadas, em nenhum dos diferentes tempos analisados.

4.4. Experimentos *in vivo* - Ensaio terapêutico e parâmetros avaliados

4.4.1. Mortalidade e sinais clínicos

Não houve morte durante os experimentos, bem como nenhuma mudança comportamental que pudesse estar relacionada ao tratamento. Além disso, não foi registrada perda de peso dos animais durante o tratamento (Fig. 4.4).

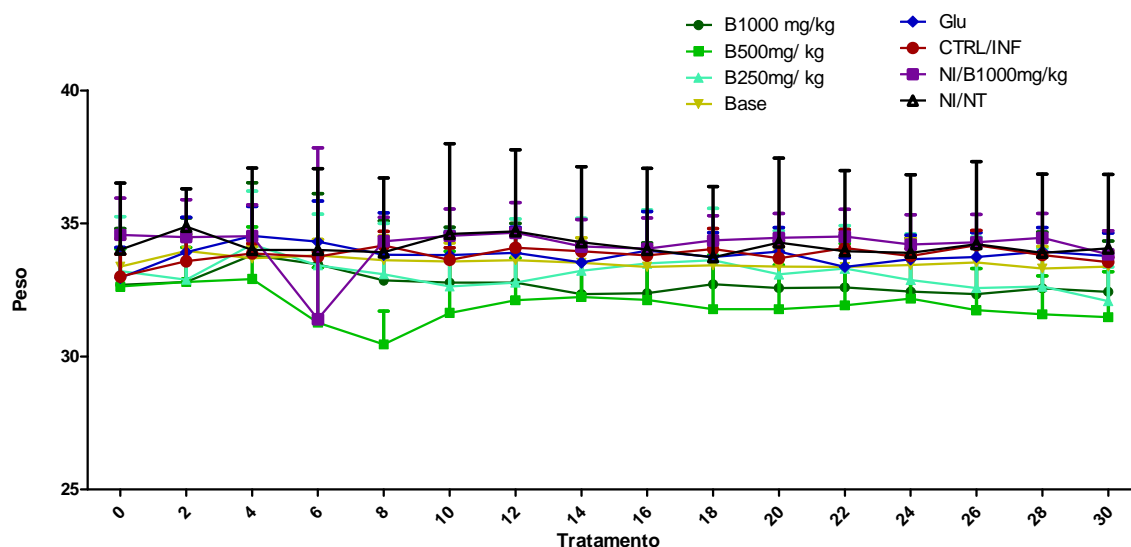


Figura 4.4 – Acompanhamento do peso corporal de 3 animais de cada grupo no decorrer do experimento – A imagem mostra a média \pm desvio padrão do peso dos animais. Não houve perda de peso significativa dos animais durante o tratamento. Os dados foram analisados no GraphPad Prism 5.0, e as diferenças entre grupos foram avaliadas através do teste Two-way ANOVA.

4.4.2. Cinética da lesão

Foram obtidas imagens do local da lesão antes do início do tratamento e após os 30 dias de tratamento (Fig. 4.5). Os animais apresentaram a partir da 6ª semana lesões ulceradas no local da inoculação (base da cauda). Antes de iniciar o tratamento as lesões foram fotografadas e medidas através da utilização de um paquímetro, até o final do tratamento, demonstrando uma cinética de lesão (Fig. 4.6).

Durante o tratamento com (-)- α -bisabolol houve uma redução do tamanho das lesões, principalmente, no grupo tratado com a maior dose de (-)- α -bisabolol – B1.000, onde foi observada uma diferença significante quando comparado aos outros grupos. O grupo B1.000, quando comparado ao grupo B500, não demonstrou diferença significante no tamanho das lesões, entretanto, quando comparamos o grupo B1.000 ao grupo B250, observamos uma diferença significativa no 21º e no 24º dia $*(p \leq 0,05)$, que aumentou para $** (p \leq 0,01)$, no 27º e no 30º dia. Quando comparamos o grupo B1.000 com o grupo Base, foi possível observar uma diferença significativa a partir do 6º dia de tratamento $** (p \leq 0,01)$, essa diferença se manteve significativa até o final do

experimento e, além disso, a diferença se intensificou no 18º dia, quando passou a ***($p \leq 0,001$).

A comparação do grupo B1.000 com o grupo Glu foi igual ao grupo anterior, começando no 6º dia e se intensificando no 18º dia de tratamento. Resultado exatamente igual, quando comparamos o grupo B1.000 com o grupo CTRL/INF.

Por volta do 17º dia de tratamento, os grupos tratados com (-)- α -bisabolol tiveram as suas lesões cicatrizadas, entretanto, após dois dias estas lesões mesmo cicatrizadas apresentaram um aumento de tamanho (Fig. 4.6), foi o que aconteceu com os grupos B500 e B250. Quando comparamos o grupo B500 ao grupo B250, vimos que não havia diferença significativa entre os dois grupos, contudo, quando comparamos o grupo B500 com o grupo Base, observamos uma diferença no 27º dia e no 30º dia de tratamento **($p \leq 0,01$). A comparação do grupo B500 com o grupo Glu mostrou uma diferença ainda que significativa, um pouco menor *($p \leq 0,05$).

Contudo, ao confrontarmos os resultados do grupo B250 com os grupos Base, Glu e CTRL/INF, vimos que não houve diferença significativa do grupo B250, tratado com 250mg/Kg/dia de (-)- α -bisabolol, com relação aos grupos controles.

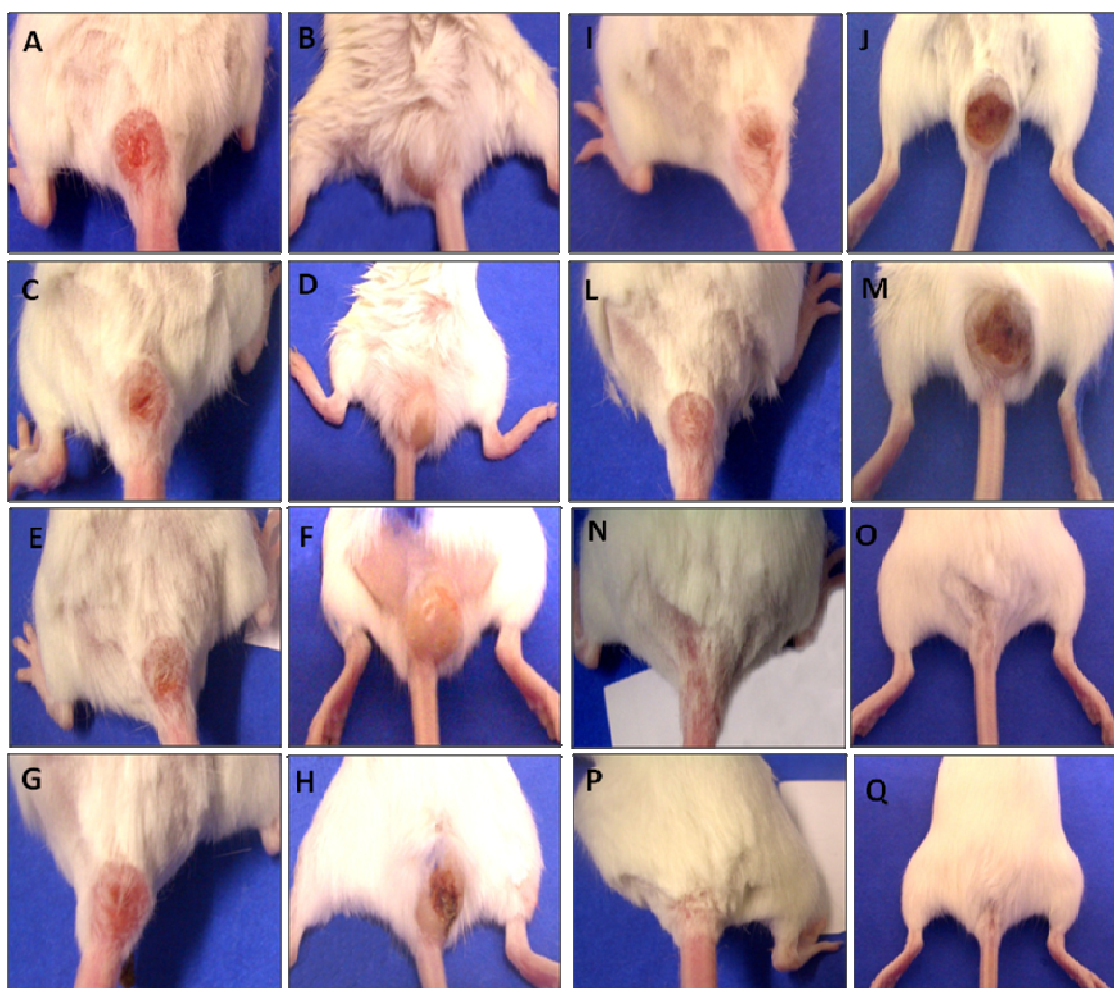


Figura 4.5 - Camundongos da linhagem BALB/c infectados, na base da cauda, com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e seus respectivos controles. As imagens mostram os mesmos animais antes do início do tratamento e após 30 dias de tratamento. A e B - Grupo B1.000, lesão na base da cauda do animal infectado antes e depois do tratamento com (-) α -bisabolol 1000mg/Kg/dia, respectivamente; C e D – B500, lesão antes e depois do tratamento com (-) α -bisabolol 500mg/Kg/dia, respectivamente; E e F – B250, lesão antes e depois do tratamento com (-) α -bisabolol 250mg/Kg/dia; G e H – Grupo Base, lesão antes e depois do tratamento com a base Lanette; I e J – Grupo Glu, lesão antes e depois do tratamento com Glucantime®; L e M – Grupo CTRL/INF, lesão dos animais infectados e não tratados, 30 dias após a infecção; N e O – Grupo NI/B1.000, animal normal não infectado, tratado com (-) α -bisabolol 1000mg/Kg/dia; P e Q – Grupo NI/NT, controle não infectado e não tratado.

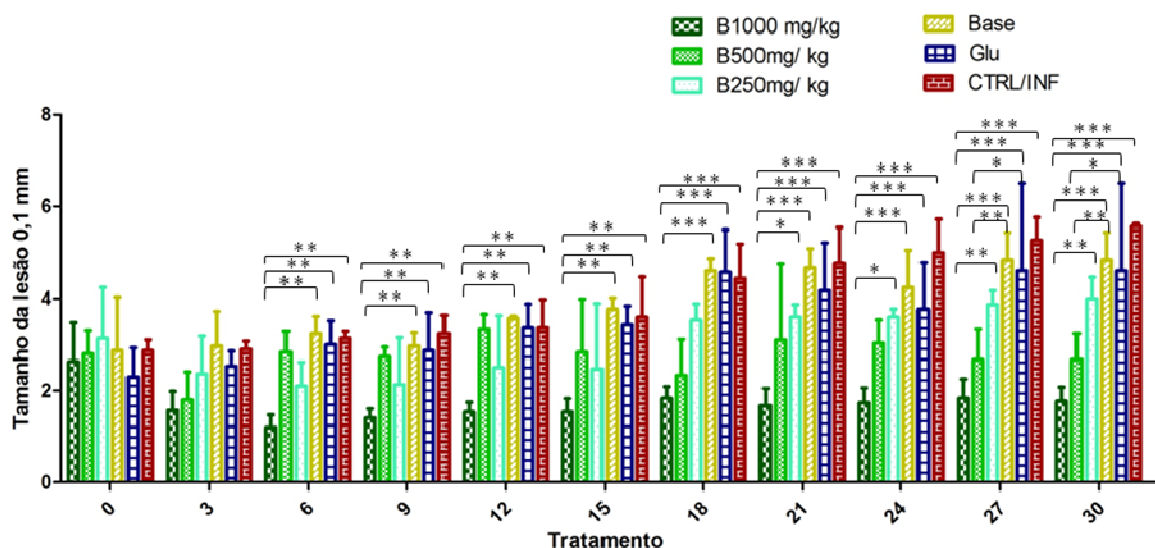


Figura 4.6 – Cinética das lesões – A progressão das lesões foi avaliada antes e durante o tratamento. As caudas dos animais foram medidas periodicamente, de três em três dias, e a espessura da área de lesão mensurada usando um paquímetro (Schnelltaster, H.C. Kröplin, GMBH, Hessen, Germany). A cinética da lesão foi expressa pelas médias da espessura (em mm) de três animais de cada grupo. Os valores representam a média \pm desvio padrão. Os dados foram analisados no GraphPad Prism 5.0, e as diferenças entre os grupos foram avaliadas através do teste Two-way ANOVA.

4.5. Parâmetros hematológicos

Os resultados das análises hematológicas demonstraram diferenças não significativas, em nenhum parâmetro avaliado, entre os grupos tratados e o grupo controle, em todos os ensaios realizados nos diferentes pontos de avaliação (Tabelas 4.1, 4.2, 4.3, 4.4 e 4.5).

Tabela 4.1 – Análise hematológica – realizada no sangue dos camundongos (n=3) após seis horas de tratamento. Os valores representam a média \pm desvio padrão.

Parâmetros	Grupos							
	B1.000	B500	B250	Base	Glu	CTRL/INF	NI/B1.000	NI/NT
Hemácias RBC x milhões/mm ³	10.5 \pm 0.9	10.7 \pm 0.9	10.4 \pm 0.2	10.9 \pm 0.5	9.63 \pm 0.7	9.29 \pm 0.8	9.95 \pm 0.3	10.7 \pm 0.1
Hemoglobina HGB (g/dl)	14.7 \pm 0.6	15.0 \pm 0.8	14.7 \pm 0.6	15.0 \pm 1.0	13.7 \pm 1.1	13.2 \pm 1.4	13.0 \pm 0.4	15.7 \pm 0.2
Hematócrito HCT (%)	50.7 \pm 2.8	51.0 \pm 3.0	50.2 \pm 2.1	53.7 \pm 0.5	46.3 \pm 3.4	45.5 \pm 3.6	46.3 \pm 1.2	53.0 \pm 0.7
Plaquetas x mil/mm ³	1.327 \pm 0.2	1.234 \pm 0.14	1.351 \pm 0.06	1.317 \pm 0.01	1.444 \pm 0.07	1.627 \pm 0.61	1.197 \pm 0.09	1.275 \pm 0.01
Leucócitos x mil/mm ³	6.0 \pm 2.8	7.8 \pm 4.1	4.3 \pm 0.4	4.8 \pm 0.1	4.3 \pm 0.1	5.9 \pm 4.1	4.5 \pm 0.4	7.0 \pm 0.8

Tabela 4.2 – Análise hematológica – realizada no sangue dos camundongos após 24 horas de tratamento. Os valores representam a média \pm desvio padrão.

Parâmetros	Grupos							
	B1.000	B500	B250	Base	Glu	CTRL/INF	NI/B1.000	NI/NT
Hemácias RBC x milhões/mm ³	10.8 \pm 0.4	10.9 \pm 0.2	10.3 \pm 0.7	10.6 \pm 0.9	10.2 \pm 0.0	10.3 \pm 0.3	10.0 \pm 0.4	10.8 \pm 0.3
Hemoglobina HGB (g/dl)	15.4 \pm 0.9	15.4 \pm 0.6	14.8 \pm 0.1	14.5 \pm 1.0	14.7 \pm 0.2	12.8 \pm 1.2	13.9 \pm 1.7	16.4 \pm 1.2
Hematócrito HCT (%)	52.4 \pm 2.4	49.8 \pm 1.6	50.1 \pm 0.0	51.5 \pm 3.6	49.5 \pm 1.0	44.6 \pm 2.3	47.7 \pm 3.1	54.3 \pm 2.6
Plaquetas x mil/mm ³	1.259 \pm 0.0	1.192 \pm 0.0	1.418 \pm 0.3	1.305 \pm 0.0	1.321 \pm 0.0	1.815 \pm 0.3	1.187 \pm 0.0	1.115 \pm 0.1
Leucócitos x mil/mm ³	6.3 \pm 0.4	7.4 \pm 0.5	4.6 \pm 0.7	4.8 \pm 0.1	4.3 \pm 0.5	7.7 \pm 1.5	5.7 \pm 2.1	9.0 \pm 2.4

Tabela 4.3 – Análise hematológica – realizada no sangue dos camundongos após 7 dias de tratamento. Os valores representam a média \pm desvio padrão.

Parâmetros	Grupos							
	B1.000	B500	B250	Base	Glu	CTRL/INF	NI/B1.000	NI/NT
Hemácias RBC x milhões/mm ³	10.5 \pm 0.5	11.0 \pm 0.0	10.8 \pm 0.7	11.2 \pm 0.0	10.7 \pm 0.2	10.3 \pm 0.3	10.5 \pm 0.5	10.9 \pm 0.4
Hemoglobina HGB (g/dl)	15.2 \pm 0.4	15.8 \pm 0.1	15.4 \pm 0.7	15.3 \pm 0.6	15.4 \pm 0.0	14.7 \pm 0.2	15.0 \pm 0.0	17.2 \pm 10.4
Hematócrito HCT (%)	51.8 \pm 0.5	42.4 \pm 17.7	52.2 \pm 3.0	52.1 \pm 2.8	53.0 \pm 1.7	50.4 \pm 0.9	50.0 \pm 0.8	53.5 \pm 4.5
Plaquetas x mil/mm ³	1.217 \pm 12.2	1.166 \pm 6.5	1.268 \pm 1.4	1.358 \pm 7.4	1.293 \pm 2.5	1.260 \pm 2.5	1.368 \pm 2.9	1.175 \pm 2.1
Leucócitos x mil/mm ³	5.5 \pm 1.7	5.5 \pm 1.4	5.1 \pm 1.4	5.1 \pm 0.6	4.8 \pm 0.2	5.7 \pm 1.2	6.1 \pm 1.0	7.1 \pm 2.4

Tabela 4.4 – Análise hematológica – realizada no sangue dos camundongos após 14 dias de tratamento. Os valores representam a média \pm desvio padrão.

Parâmetros	Grupos							
	B1.000	B500	B250	Base	Glu	CTRL/INF	NI/B1.000	NI/NT
Hemácias RBC x milhões/mm ³	11.2 \pm 0.3	11.1 \pm 0.1	11.3 \pm 0.7	10.0 \pm 1.8	10.3 \pm 0.2	9.4 \pm 1.0	10.3 \pm 0.1	11.12 \pm 0.2
Hemoglobina HGB (g/dl)	16.1 \pm 0.7	15.9 \pm 0.0	15.9 \pm 0.0	14.3 \pm 2.1	14.9 \pm 0.6	13.5 \pm 1.9	15.2 \pm 0.3	19.3 \pm 0.0
Hematócrito HCT (%)	54.1 \pm 2.6	29.5 \pm 0.4	54.2 \pm 0.2	49.0 \pm 7.1	50.3 \pm 2.1	46.3 \pm 4.7	52.2 \pm 0.9	56.2 \pm 0.7
Plaquetas x mil/mm ³	1.191 \pm 1.6	1.150 \pm 0.8	1.166 \pm 0.0	1.305 \pm 0.0	1.252 \pm 0.01	1.571 \pm 0.6	1.240 \pm 0.1	1.023 \pm 0.0
Leucócitos x mil/mm ³	6.7 \pm 0.8	7.0 \pm 0.7	5.1 \pm 1.3	4.7 \pm 0.1	4.4 \pm 0.7	6.6 \pm 3.1	7.2 \pm 2.5	7.3 \pm 2.1

Tabela 4.5 – Análise hematológica – realizada no sangue dos camundongos após 30 dias de tratamento. Os valores representam a média \pm desvio padrão.

Parâmetros	Grupos							
	B1.000	B500	B250	Base	Glu	CTRL/inf	NI/B1.000	NI/NT
Hemácias RBC x milhões/mm ³	10.2 \pm 1.0	11.1 \pm 0.2	10.3 \pm 0.3	11.2 \pm 0.2	10.9 \pm 0.1	10.6 \pm 0.2	11.0 \pm 0.6	10.6 \pm 0.3
Hemoglobina HGB (g/dl)	14.9 \pm 1.2	15.7 \pm 0.2	14.9 \pm 0.0	14.9 \pm 0.0	15.4 \pm 1.1	14.5 \pm 0.4	15.0 \pm 0.0	14.6 \pm 0.3
Hematócrito HCT (%)	51.4 \pm 3.8	55.0 \pm 0.9	50.1 \pm 1.4	50.1 \pm 1.4	54.3 \pm 0.1	51.1 \pm 2.1	50.3 \pm 0.2	50.3 \pm 0.2
Plaquetas x mil/mm ³	1.130 \pm 11.2	857.0 \pm 39.0	1.671 \pm 8.2	1.411 \pm 2.9	1.772 \pm 3.2	1.745 \pm 13.8	1.786 \pm 4.8	1.785 \pm 4.8
Leucócitos x mil/mm ³	5.0 \pm 0.7	4.5 \pm 0.1	4.1 \pm 1.3	5.6 \pm 0.7	4.7 \pm 0.4	6.2 \pm 2.4	7.9 \pm 0.8	7.9 \pm 0.8

4.6. Parâmetros bioquímicos

Os resultados da análise bioquímica não demonstraram diferenças significativas em nenhum dos parâmetro avaliados entre os grupos tratados e o grupo controle, em todos os ensaios realizados (Tabelas 4.6, 4.7, 4.8, 4.9 e 4.10).

Tabela 4.6 – Análise bioquímica – realizada nos soros dos camundongos após seis horas de tratamento. Os valores representam a média \pm desvio padrão.

Parâmetros	Grupos							
	B1.000	B500	B250	Base	Glu	CTRL/INF	NI/B1.000	NI/NT
Proteínas Totais (PT)	4.1 \pm 0.1	7.5 \pm 0.7	5.0 \pm 0.2	5.4 \pm 0.2	5.2 \pm 0.3	5.6 \pm 0.3	5.2 \pm 0.2	5.2 \pm 0.2
Albumina	2.0 \pm 0.0	3.7 \pm 0.2	1.8 \pm 2.1	1.8 \pm 0.0	1.8 \pm 0.4	1.8 \pm 0.1	1.9 \pm 0.0	1.9 \pm 0.0
Bilirrubina Total	0.3 \pm 0.0	0.6 \pm 0.2	0.4 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0
Trans. Glutâm. oxilacética (TGO)	114.0 \pm 11.3	117.0 \pm 18.3	202.5 \pm 12.0	116.5 \pm 24.7	189.0 \pm 29.6	95.0 \pm 4.9	114.0 \pm 17.6	112.5 \pm 26.1
Uréia	43.0 \pm 4.9	48.8 \pm 0.9	40.1 \pm 0.2	37.7 \pm 3.3	38.7 \pm 2.1	44.8 \pm 1.0	40.0 \pm 2.8	40.0 \pm 2.8
Creatinina	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0

Tabela 4.7 – Análise bioquímica – realizada nos soros dos camundongos após 24 horas de tratamento. Os valores representam a média \pm desvio padrão.

Parâmetros	Grupos							
	B1.000	B500	B250	Base	Glu	CTRL/INF	NI/B1.000	NI/NT
Proteínas Totais (PT)	4.7 \pm 0.0	5.1 \pm 0.4	5.1 \pm 0.2	4.7 \pm 0.3	5.1 \pm 0.7	5.7 \pm 0.4	5.2 \pm 0.3	5.9 \pm 1.2
Albumina	2.6 \pm 0.0	2.8 \pm 0.0	2.6 \pm 0.0	2.5 \pm 0.2	2.9 \pm 0.5	3.1 \pm 0.4	2.3 \pm 0.2	2.7 \pm 0.2
Bilirrubina Total	0.4 \pm 0.0	0.5 \pm 0.1	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.2	0.5 \pm 0.1	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0
Trans. Glutâm. Oxilacética (TGO)	120.0 \pm 8.4	131.0 \pm 7.0	181.7 \pm 29.3	204 \pm 7.6	244.0 \pm 43.8	248.0 \pm 18.6	118.0 \pm 2.8	220.2 \pm 28.6
Uréia	40.7 \pm 1.6	43.4 \pm 4.4	40.0 \pm 2.8	44.1 \pm 9.0	42.9 \pm 1.5	44.2 \pm 2.6	41.5 \pm 2.1	44.7 \pm 6.6
Creatinina	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0

Tabela 4.8 – Análise bioquímica – realizada nos soros dos camundongos após 7 dias de tratamento. Os valores representam a média \pm desvio padrão.

Parâmetros	Grupos							
	B1.000	B500	B250	Base	Glu	CTRL/INF	NI/B1.000	NI/NT
Proteínas Totais (PT)	4.6 \pm 0.0	4.7 \pm 0.1	4.8 \pm 0.2	4.6 \pm 0.0	5.3 \pm 0.2	5.1 \pm 0.4	4.9 \pm 0.1	4.7 \pm 0.4
Albumina	2.2 \pm 0.1	2.3 \pm 0.0	2.4 \pm 0.2	2.3 \pm 0.0	2.4 \pm 0.0	2.4 \pm 0.4	1.9 \pm 0.1	1.7 \pm 0.2
Bilirrubina Total	0.4 \pm 0.0	0.2 \pm 0.2	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.0	0.8 \pm 0.4	0.2 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0
Trans. Glutâm. Oxilacética (TGO)	196.0 \pm 7.0	224.0 \pm 46.6	185.5 \pm 16.2	179.5 \pm 19.0	249.5 \pm 33.2	236.0 \pm 18.6	120.0 \pm 12.7	110.5 \pm 12.0
Uréia	47.0 \pm 4.2	56.5 \pm 0.7	46.0 \pm 5.6	51.9 \pm 2.9	54.3 \pm 1.8	52.7 \pm 4.1	40.0 \pm 7.0	39.0 \pm 11.3
Creatinina	0.1 \pm 0.0	0.2 \pm 0.1	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0

Tabela 4.9 – Análise bioquímica – realizada nos soros dos camundongos após 14 dias de tratamento. Os valores representam a média \pm desvio padrão.

Parâmetros	Grupos							
	B1.000	B500	B250	Base	Glu	CTRL/INF	NI/B1.000	NI/NT
Proteínas Totais (PT)	5.4 \pm 0.2	5.4 \pm 0.2	5.5 \pm 0.2	5.6 \pm 0.5	5.6 \pm 0.3	5.6 \pm 0.3	5.5 \pm 0.2	5.1 \pm 0.2
Albumina	1.9 \pm 0.1	1.7 \pm 0.0	1.7 \pm 0.0	1.9 \pm 0.0	1.9 \pm 0.0	2.2 \pm 0.2	2.3 \pm 0.2	2.8 \pm 0.0
Bilirrubina	0.4 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0	0.3 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0	0.4 \pm 0.1	0.6 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1
Trans. Glutâm. Oxilacética (TGO)	123.5 \pm 41.7	146.0 \pm 19.7	145.5 \pm 30.4	161.5 \pm 57.2	132.5 \pm 37.4	167.0 \pm 6.3	189.5 \pm 19.0	200.5 \pm 4.9
Trans. Glutâm. Pirúvica (TGP)	107.0 \pm 22.7	97.0 \pm 5.6	140.0 \pm 13.4	112.5 \pm 14.8	119.5 \pm 10.6	125.5 \pm 19.0	101.0 \pm 7.0	98.0 \pm 7.0
Uréia	64.7 \pm 6.6	53.2 \pm 2.5	53.4 \pm 15.6	62.3 \pm 7.4	63.1 \pm 8.9	69.8 \pm 4.5	49.2 \pm 13.8	47.1 \pm 4.0
Creatinina	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0

Tabela 4.10 – Análise bioquímica – realizada nos soros dos camundongos após 30 dias de tratamento. Os valores representam a média \pm desvio padrão.

Parâmetros	Grupos							
	B1.000	B500	B250	Base	Glu	CTRL/INF	NI/B1.000	NI/NT
Proteínas Totais (PT)	5.1 \pm 0.6	5.4 \pm 0.5	5.1 \pm 0.0	5.4 \pm 0.2	5.1 \pm 0.2	5.4 \pm 0.5	5.0 \pm 0.1	5.1 \pm 0.2
Albumina	2.8 \pm 0.9	2.9 \pm 0.8	2.2 \pm 0.0	2.0 \pm 0.2	2.0 \pm 0.3	2.0 \pm 0.3	2.2 \pm 0.1	2.4 \pm 0.0
Bilirrubina	0.6 \pm 0.1	0.5 \pm 0.0	0.5 \pm 0.1	0.5 \pm 0.0	0.4 \pm 0.0	0.4 \pm 0.1	0.5 \pm 0.1	0.5 \pm 0.0
Trans. Glutâm. Oxilacética (TGO)	136.1 \pm 9.0	155.0 \pm 49.4	134.5 \pm 0.0	220.0 \pm 12.6	158.0 \pm 35.0	133.1 \pm 6.7	144.2 \pm 18.0	108.4 \pm 32.6
Trans. Glutâm. Pirúvica (TGP)	96.5 \pm 7.7	97.0 \pm 5.6	124.0 \pm 38.1	120.5 \pm 26.1	71.0 \pm 1.4	80.0 \pm 2.8	85.0 \pm 1.4	90.0 \pm 18.3
Uréia	56.7 \pm 19.0	51.0 \pm 4.2	54.1 \pm 7.6	44.5 \pm 1.2	39.4 \pm 1.8	37.9 \pm 4.5	53.0 \pm 4.4	42.4 \pm 5.3
Creatinina	0.2 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	0.2 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0	0.1 \pm 0.0

4.7. Análise histopatológica

4.7.1. Seis horas após o tratamento

A avaliação histopatológica da cauda, neste primeiro ponto de necropsia, demonstrou certa homogeneidade com relação às lesões, ao compararmos os grupos tratados ao grupo infectado não tratado. Alguns animais demonstraram lesões mais ulceradas do que outros, entretanto, todos apresentaram um padrão de lesão com intenso infiltrado inflamatório, com inúmeros macrófagos vacuolizados, densamente parasitados, e com a presença de polimorfonucleares (PMN).

Nos animais do grupo B1.000, tratados com 1.000mg de (-)- α -bisabolol, após seis horas de tratamento, foi possível observar lesão com muitos parasitos na epiderme e, principalmente, na derme (Fig. 4.7A), além de ulceração (Fig. 4.7B), com a presença de infiltrado inflamatório, com muitos neutrófilos e eosinófilos (Fig. 4.7C). A análise dos cortes corados pelo Picrosirius red revelou a presença de fibras de colágeno entre as células do processo inflamatório presentes na derme (Fig. 4.7D).

A análise histopatológica do grupo B500, cujos animais foram tratados com 500mg de (-)- α -bisabolol, revelou intenso parasitismo e muito infiltrado inflamatório, tanto na derme como na epiderme (Fig. 4.8A e C); foi possível observar também, além do, infiltrado inflamatório e da grande quantidade de parasito, a desagregação das fibras da matriz extracelular (Fig.4.8B). A coloração pela técnica de Picrosirius red revelou menor quantidade de fibras de colágeno, entre as células do processo inflamatório e os parasitos na derme, demonstrando, também, a desagregação das fibras da matriz extracelular (Fig.4.8D).

Os animais do grupo B250, tratados com 250mg de (-)- α -bisabolol, demonstraram pela coloração de HE intenso parasitismo no tecido e infiltrado inflamatório na derme e epiderme com lesão ulcerada (Fig. 4.9A). Através da coloração pelo Giemsa de Lennert foi possível observar também intenso infiltrado inflamatório com a presença de exsudato inflamatório na epiderme (Fig. 4.9B e C). A coloração pelo Picrosirius red permitiu evidenciar as fibras de colágeno destruídas pelo intenso processo inflamatório e pelos parasitos (Fig. 4.9D).

A análise do grupo Base, tratado somente com a base, após seis horas do primeiro tratamento, mostrou da mesma forma grande quantidade de parasitos no tecido e infiltrado inflamatório na derme, além da presença de lesão ulcerada com

desagregação da epiderme (Fig. 4.10A); utilizando a coloração de Giemsa foi possível observar também infiltrado inflamatório, constituído, principalmente, por neutrófilos e parasito na derme (Fig. 4.10B e C). Através da coloração pelo Picrosirius red, observamos as fibras de colágeno entre as células do processo inflamatório com presença de exsudato inflamatório na parte superficial da lesão (Fig. 4.10D).

A avaliação histopatológica do grupo Glu, tratado com Glucantime[®], demonstrou intenso parasitismo no tecido e infiltrado inflamatório na derme e epiderme com ulceração da lesão, evidenciado pela coloração de HE (Fig. 4.11A). Através da coloração de Giemsa de Lennert observamos também intenso infiltrado inflamatório na derme (Fig. 4.11B e C). Além disso, foi possível observar a lesão com presença de exsudato inflamatório na epiderme e na derme através da coloração pelo Picrosirius red (Fig. 4.11D).

Ao analisarmos os animais do grupo CTRL/INF, grupo controle somente infectado, observamos intenso parasitismo e vacúolo parasitário, com presença de células inflamatórias na derme (Fig. 4.12A). Com a coloração pelo método de Giemsa de Lennert foi possível observar, novamente, intenso infiltrado inflamatório, com presença de neutrófilos e eosinófilos na derme (Fig. 4.12B e C), e com a coloração pelo Picrosirius red visualizamos as fibras de colágeno entre as células do processo inflamatório, sem muita alteração das mesmas (Fig. 4.12D).

Os animais do grupo NI/B1.000, não infectados, e tratados com 1.000mg de (-)- α -bisabolol, mostraram o tecido com características normais sem alterações na derme e epiderme após o tratamento (Fig. 4.13A e 4.13B). A coloração por Picrosirius red mostrou fibras de colágeno espessas de aspecto normal (Fig. 4.13C).

O grupo NI/NT, animais não infectados e não tratados, assim como o grupo NI/B1.000, animais não infectados e tratados, não mostraram nenhuma alteração histopatológica, estando a pele com características normais sem alterações na derme e epiderme (Fig. 4.14A e 4.14B). Através da coloração pelo Picrosirius red foi possível demonstrar fibras de aspecto normal (Fig. 4.14C), nos animais do grupo NI/NT estas observações mostraram grande similaridade com o grupo NI/B1.000.

Grupo B1.000 – Seis horas após o tratamento.

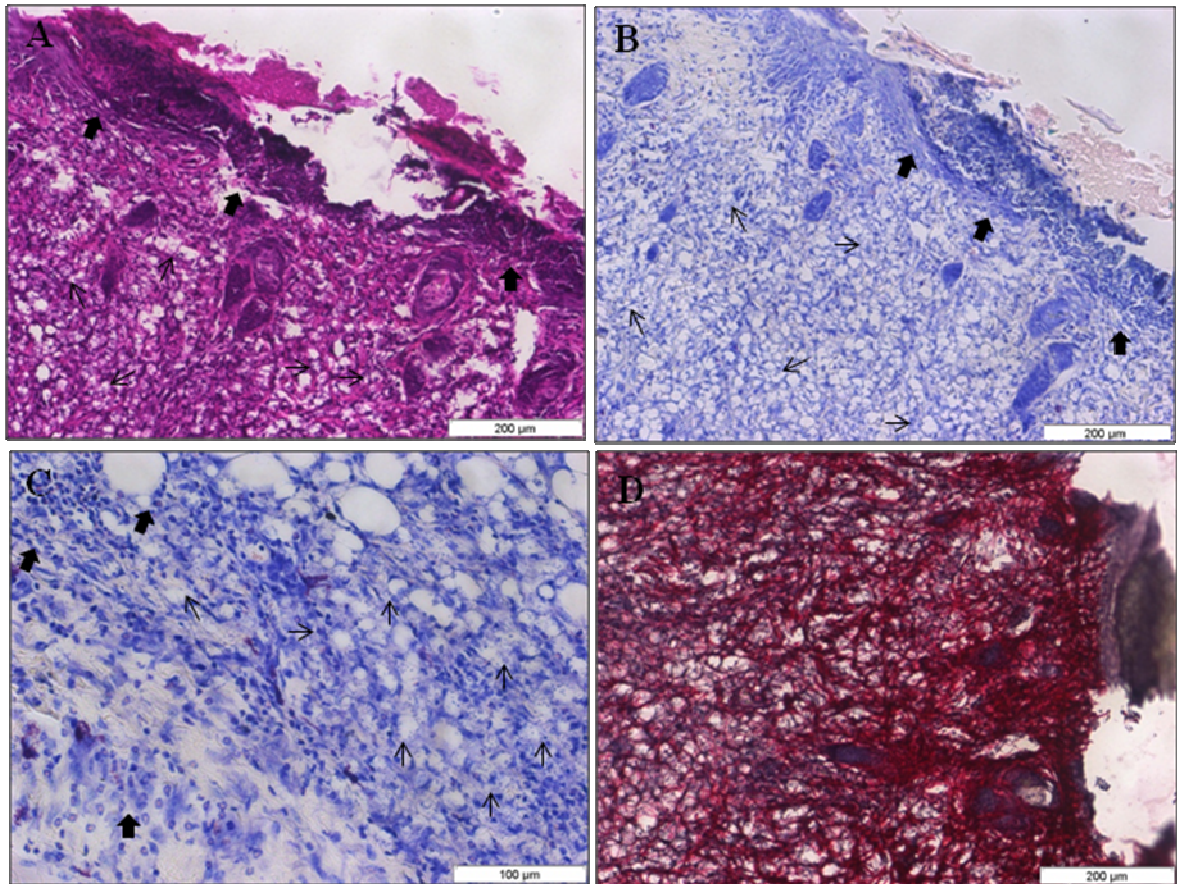


Figura 4.7 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com (-) α -bisabolol 1.000mg/Kg/dia, após seis horas de tratamento – Grupo B1.000. A: Coloração pela técnica de HE - lesão ulcerada com exsudato e grande quantidade de macrófagos vacuolizados, densamente parasitados (seta), e infiltrado inflamatório na derme e epiderme; B e C: Coloração pela técnica de Giemsa de Lennert; B: infiltrado inflamatório (setas largas) e grande quantidade de parasitos na derme (seta); C: intenso parasitismo (setas) e infiltrado inflamatório (setas largas); D: Coloração pela técnica de Picrosirius red - marcação das fibras de colágeno entre as células do processo inflamatório e parasitos na derme, com destruição da epiderme devido a lesão ulcerada.

Grupo B500 – Seis horas após o tratamento.

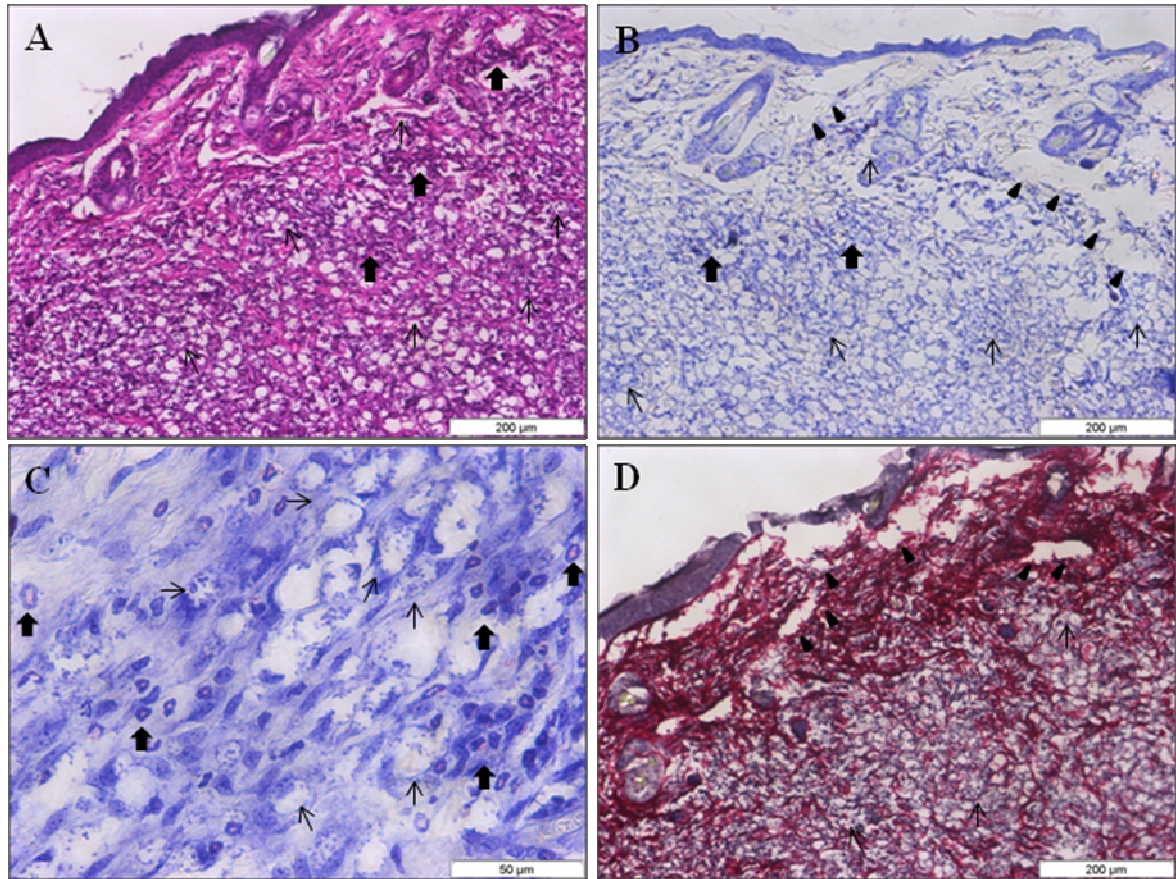


Figura 4.8 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com (-) α -bisabolol 500mg/Kg/dia, após seis horas de tratamento – Grupo B500. A: Coloração pela técnica de HE - intenso parasitismo (setas) e infiltrado inflamatório (setas largas) na derme e epiderme; B e C: Coloração pela técnica de Giemsa; B: infiltrado inflamatório (setas largas) e grande quantidade de parasito (setas) com destruição de fibras na parte superficial da derme e desagregação das fibras da matriz extracelular (ponta de seta); C: grande quantidade de parasitos (setas) com presença de neutrófilos e eosinófilos em torno (setas largas); D: A coloração pela técnica de Picrosirius red evidenciou fibras de colágeno entre as células do processo inflamatório e parasito na derme, demonstrando a destruição destas fibras (ponta de seta).

Grupo B250 – Seis horas após o tratamento.

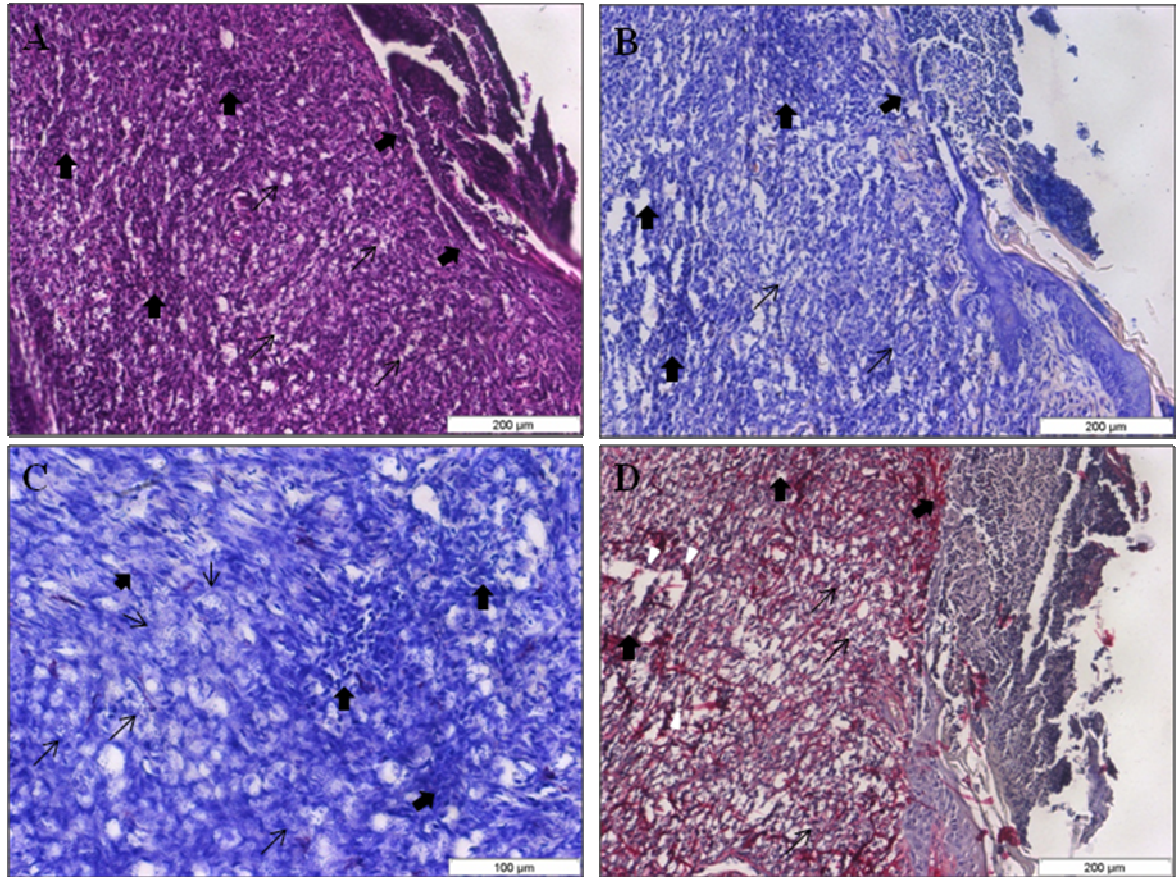


Figura 4.9 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com (-) α -bisabolol 250mg/Kg/dia, após seis horas de tratamento – Grupo B250. A: Coloração pela técnica de HE observa-se intenso parasitismo no tecido (setas) e infiltrado inflamatório na derme (setas largas) com lesão ulcerada; B e C: Coloração pela técnica de Giemsa de Lennert; B: mostra intenso infiltrado inflamatório (setas largas) e grande quantidade de parasito (setas) com presença de exsudato inflamatório na epiderme; C: grande quantidade de parasitos (setas) e presença de infiltrado inflamatório, constituído, principalmente, por neutrófilos (setas largas); D: Coloração pelo Picrosirius red mostra a marcação das fibras de colágeno destruídas (ponta de seta) pelo intenso processo inflamatório e pelos parasitos.

Grupo Base – Seis horas após o tratamento.

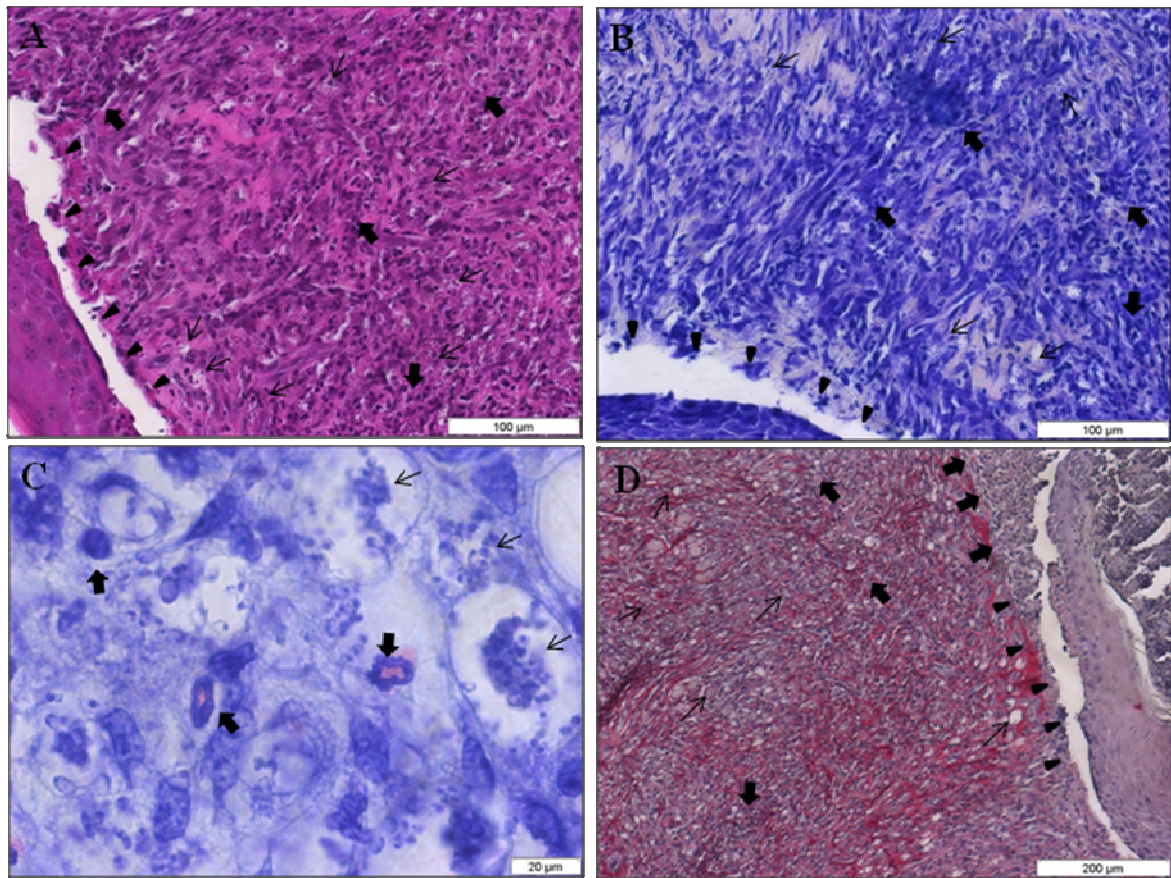


Figura 4.10 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com base (somente creme Lanette), após seis horas de tratamento – Grupo Base. A: Coloração pela técnica de HE - grande quantidade de parasitos no tecido (seta) e infiltrado inflamatório na derme (seta larga) além da, desagregação da epiderme (ponta de seta); B e C: Coloração pela técnica de Giemsa de Lennert; B: infiltrado inflamatório na derme com presença de parasito e desagregação da epiderme (ponta de seta); C: grande quantidade de parasitos (setas) e células inflamatórias (setas largas); D: Coloração pela técnica do Picrosirius red, marcação das fibras de colágeno entre as células do processo inflamatório e parasitos (setas) com presença de exsudato inflamatório na parte superficial da lesão (setas largas).

Grupo Glu – Seis horas após o tratamento.

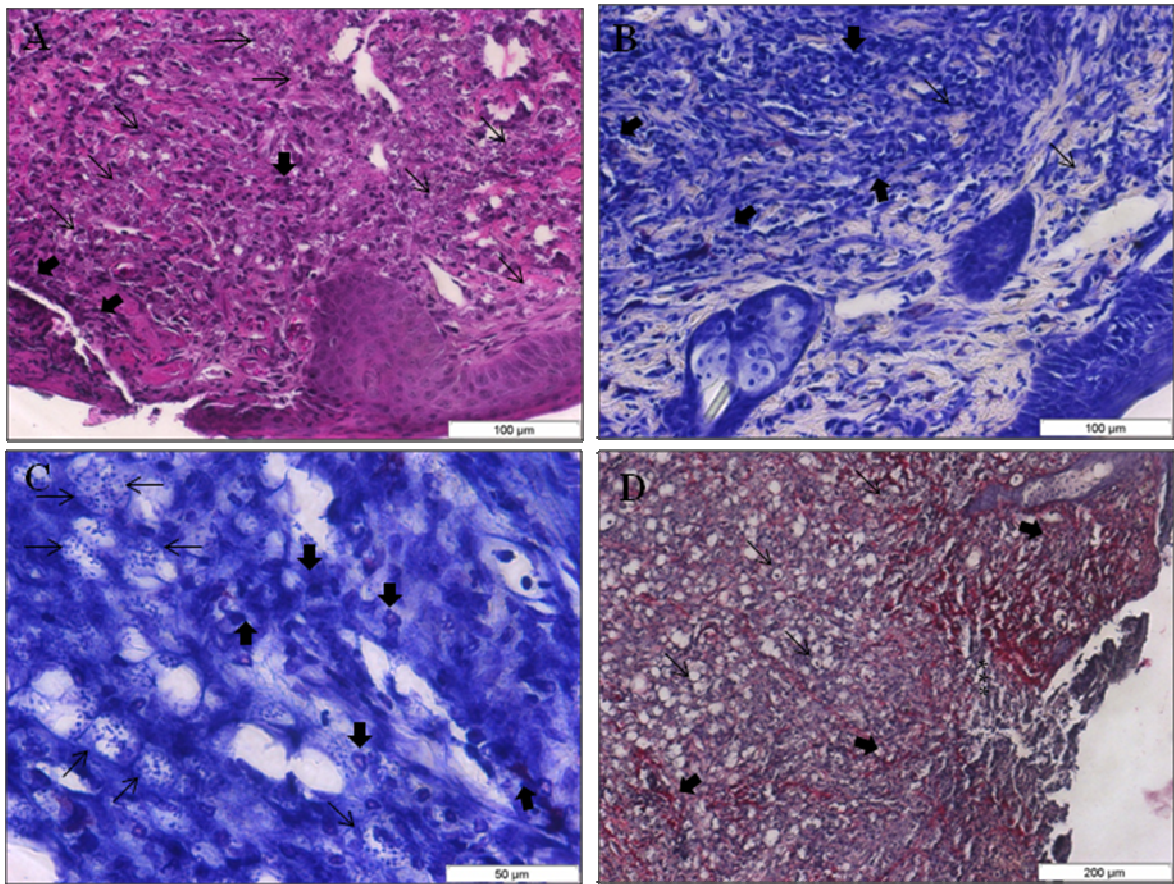


Figura 4.11 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com Glucantime[®], após seis horas de tratamento – Grupo Glu. A: Coloração pela técnica de HE - intenso parasitismo (seta) no tecido e infiltrado inflamatório (seta larga) na derme e epiderme com ulceração da lesão; B e C: Coloração pela técnica de Giemsa de Lennert; B: intenso infiltrado inflamatório na derme (seta larga); C: intenso parasitismo (setas) e células inflamatórias ao redor (setas largas), constituído, principalmente, por neutrófilos e eosinófilos; D: Coloração pelo Picrosirius red evidencia as fibras de colágeno entre as células do processo inflamatório e parasito, sendo possível observar lesão com presença de exsudato inflamatório na epiderme e na derme superficial (asterisco).

Grupo CTRL/INF

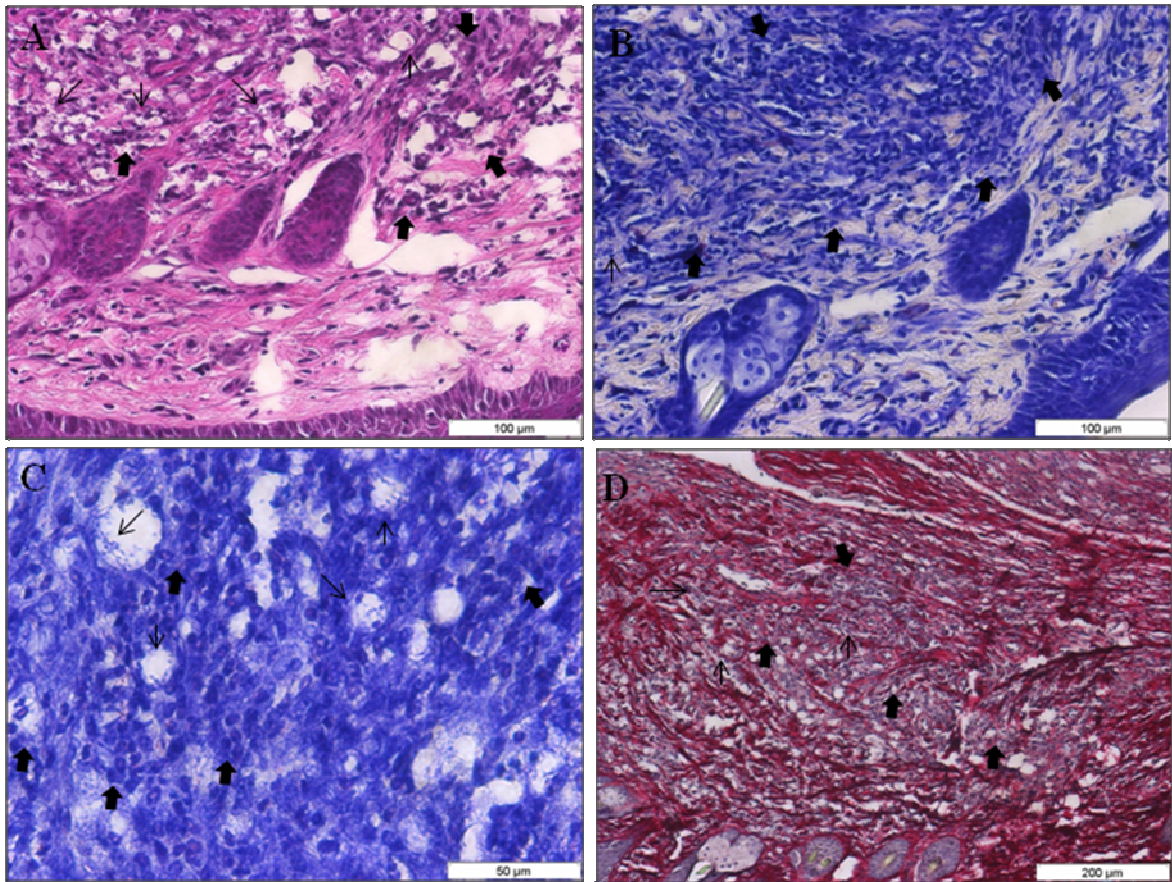


Figura 4.12 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis*, no primeiro ponto de necropsia – Grupo CTRL/INF. A: Coloração pela técnica de HE - intenso parasitismo e vacúolo parasitário (seta) com presença de células inflamatórias na derme (seta larga); B e C: Coloração pelo método de Giemsa de Lennert; B: intenso infiltrado inflamatório na derme (seta larga) e parasito; C: intenso infiltrado inflamatório, constituído, principalmente, por neutrófilos (setas largas) e a presença de parasitos (setas); D: Coloração pelo Picrosirius red mostra as fibras de colágeno entre as células do processo inflamatório e parasito, sem muita alteração das mesmas (seta larga).

Grupo NI/B1.000 – Seis horas após o tratamento.

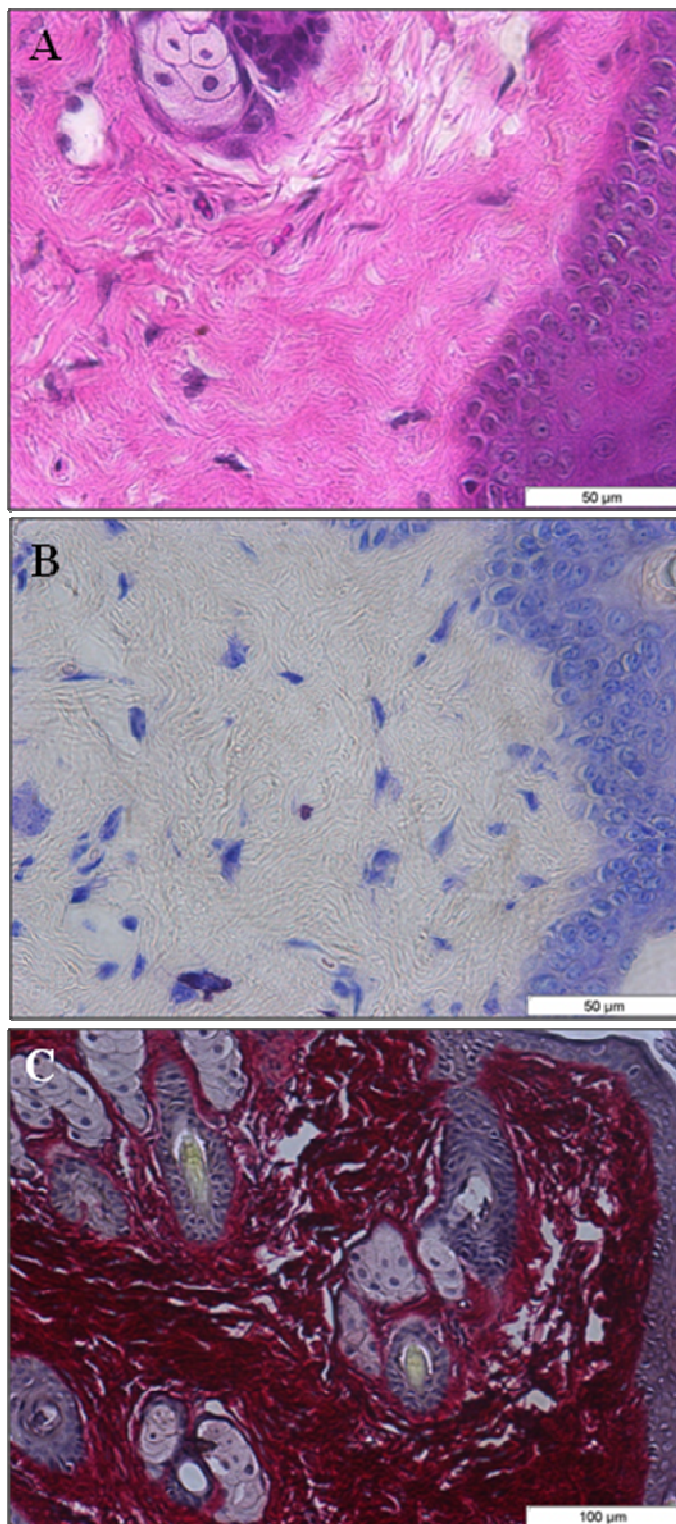


Figura 4.13 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, não infectados mas tratados com (-) α -bisabolol 1.000mg/Kg/dia, após seis horas de tratamento – Grupo NI/B1.000. A: Coloração pela técnica de HE, tecido com características normais sem alterações; B: Coloração pela técnica de Giemsa de Lennert observa-se tecido sem alterações; C: Coloração pela técnica de Picrosirius red, marcação das fibras de colágeno demonstrando fibras espessas de aspecto normal.

Grupo NI/NT

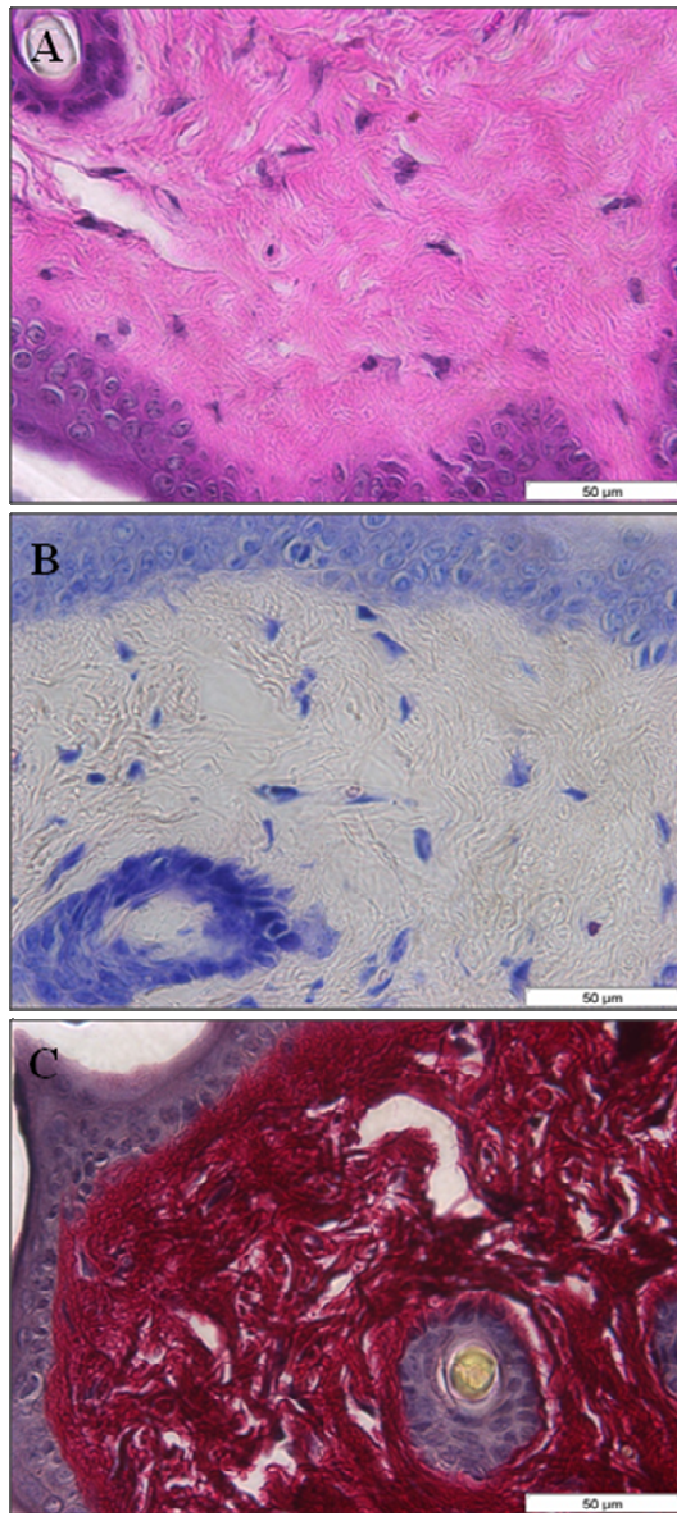


Figura 4.14 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, não infectados e não tratados, no primeiro ponto de necropsia – Grupo NI/NT. A: Coloração pela técnica de HE, tecido com características normais sem alterações na derme e epiderme; B: Coloração de Giemsa – observa-se tecido sem alterações; C: Coloração pela técnica do Picrosirius red, marcação das fibras de colágeno demonstrando fibras compactadas de aspecto normal.

4.7.2. 24 horas após o tratamento

A análise histopatológica, dos três animais de cada grupo, demonstrou semelhança entre os grupos infectados e tratados em relação ao grupo CTRL/INF, somente infectado. Assim como não houve diferença nos resultados entre as análises realizadas em diferentes horas de tratamento, seis e 24 horas após. Além disto, o grupo NI/B1.000, não infectado e tratado com (-) α -bisabolol 1000mg/Kg/dia, e o grupo NI/NT, não infectado e não tratado, se mantiveram sem nenhuma alteração (resultados não mostrados).

O grupo B1.000, animais tratados com (-) α -bisabolol 1000mg/Kg/dia, manteve o intenso parasitismo e infiltrado inflamatório (Fig 4.15B), e foi possível evidenciar a presença de vasos sanguíneos com intenso infiltrado inflamatório em torno dos mesmos (Fig. 4. 15D), além da consequente desorganização da arquitetura tecidual na derme, provavelmente, devido ao intenso infiltrado inflamatório (Fig 4.15A e B). O grupo B500, tratados com (-) α -bisabolol 500mg/Kg/dia, mostrou similaridade histopatológica com o grupo B1.000, demonstrando intenso parasitismo com muito infiltrado inflamatório (Fig. 4.16A, B e C) e desagregação das fibras da matriz extracelular (Fig. 4.16B e D).

A análise do grupo B250 também não mostrou diferença. Foi observado intenso parasitismo, muito infiltrado inflamatório na derme e epiderme (Fig. 4.17A, B e C) e desagregação das fibras da matriz extracelular (Fig. 4.17A, B e D). O grupo Base também não foi diferente dos grupos citados acima, demonstrando intenso parasitismo (Fig. 4.18A, B, C e D), muito infiltrado inflamatório (Fig.4.18B) com desagregação das fibras da matriz extracelular (Fig. 4.18A).

Os mesmos resultados foram encontrados nos grupos Glu e CTRL/INF, os quais mostraram intenso parasitismo, muito infiltrado inflamatório (Fig. 4.19A, B e C e 4.20A, B e C), com desagregação das fibras da matriz extracelular (Fig. 4.19 A, 4.20A e D). Os grupos NI/B1.000 e NI/NT mantiveram também o mesmo padrão das análises realizadas após seis horas de tratamento, demonstrando características normais sem qualquer alteração na derme e epiderme (dados não mostrados).

Grupo B1.000 – 24 horas após o tratamento.

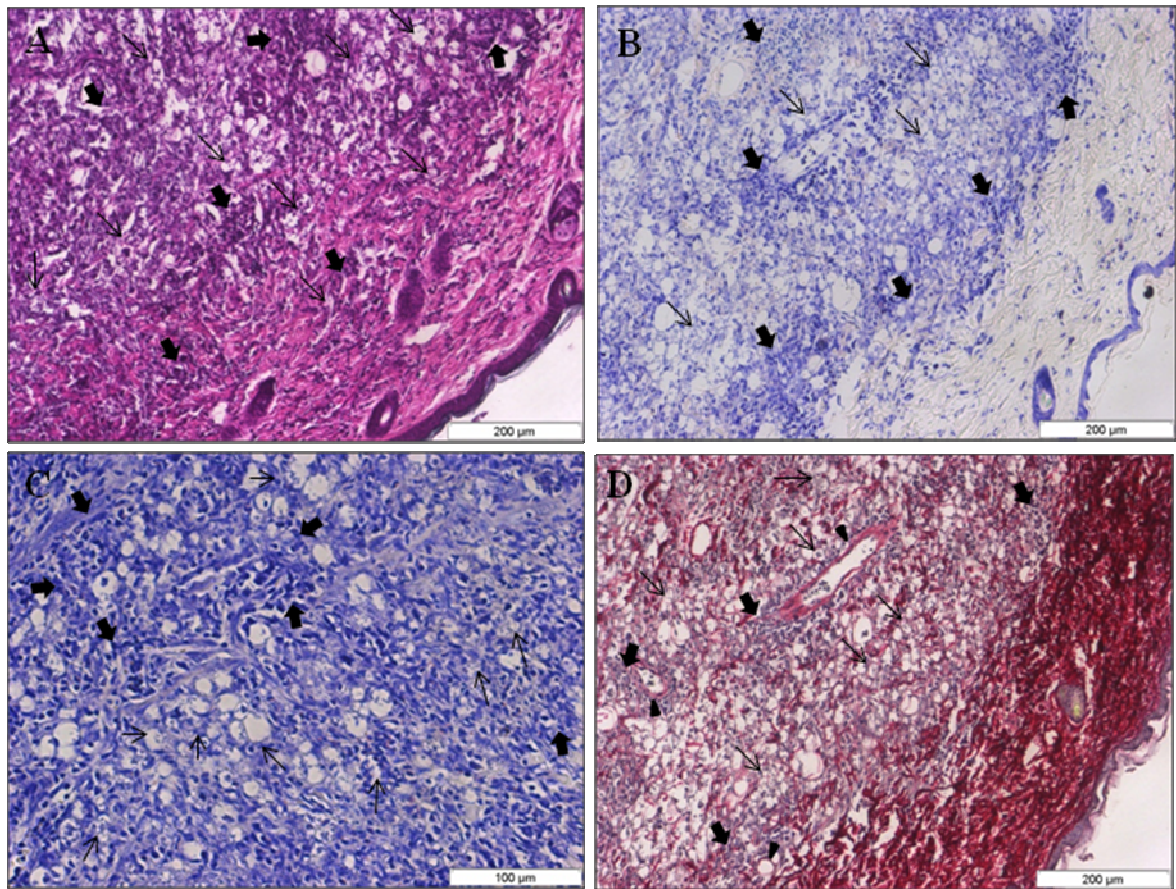


Figura 4.15 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com (-) α -bisabolol 1.000mg/Kg/dia, após 24 horas de tratamento – Grupo B1.000. A: Coloração pela técnica de HE - intenso parasitismo (setas), e infiltrado inflamatório (setas largas), com consequente desorganização da arquitetura tecidual na derme, além de células inflamatórias na epiderme (setas largas); B e C: Coloração pela técnica de Giemsa; B: infiltrado inflamatório (setas largas) e grande quantidade de parasito na derme (setas); C: intenso infiltrado inflamatório (setas largas) e grande quantidade de parasitos (setas); D: A coloração por Picrosirius red evidenciou a presença de vasos sanguíneos (ponta de seta), sendo possível observar intenso infiltrado inflamatório em torno dos mesmos (seta larga), além de permitir a marcação das fibras de colágeno entre as células do processo inflamatório e parasitos na derme.

Grupo B500 – 24 horas após o tratamento.

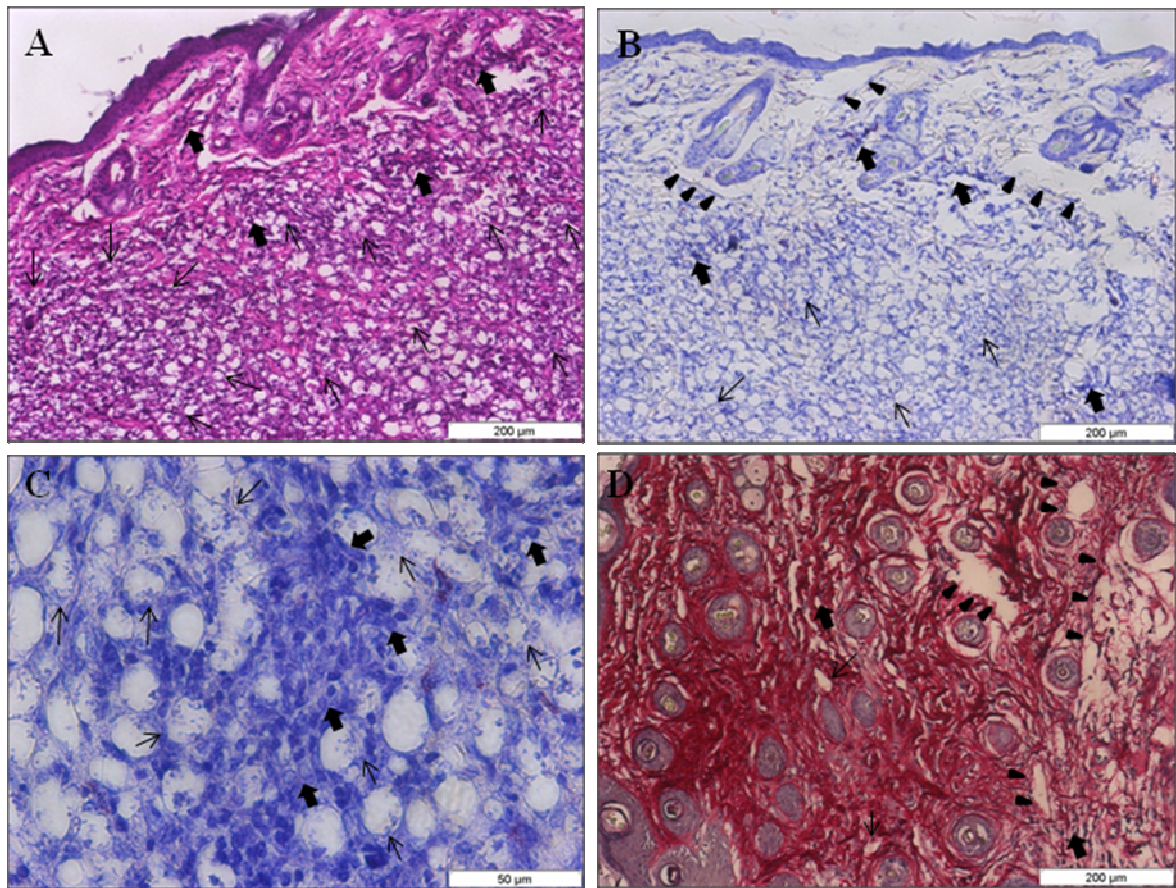


Figura 4.16 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com (-) α -bisabolol 500mg/Kg/dia, após 24 horas de tratamento – Grupo B500. A: Coloração pela técnica de HE - intenso parasitismo (setas), muito infiltrado inflamatório (setas largas) na derme e epiderme e desagregação das fibras da matriz extracelular (ponta de seta); B e C: Coloração pela técnica de Giemsa de Lennert - mostrou infiltrado inflamatório (setas largas) e grande quantidade de parasitos (setas) com destruição de fibras de colágeno na epiderme e desagregação das fibras da matriz extracelular (ponta de seta); C: intenso parasitismo (setas) e grande quantidade de infiltrado inflamatório (setas largas), constituído, principalmente, por neutrófilos na parte mais profunda da lesão; D: Coloração pela técnica do Picrosirius red observa-se as fibras de colágeno entre as células do processo inflamatório (setas largas) e parasito (setas), com desagregação das fibras da matriz extracelular (ponta de seta).

Grupo B250 – 24 horas após o tratamento.

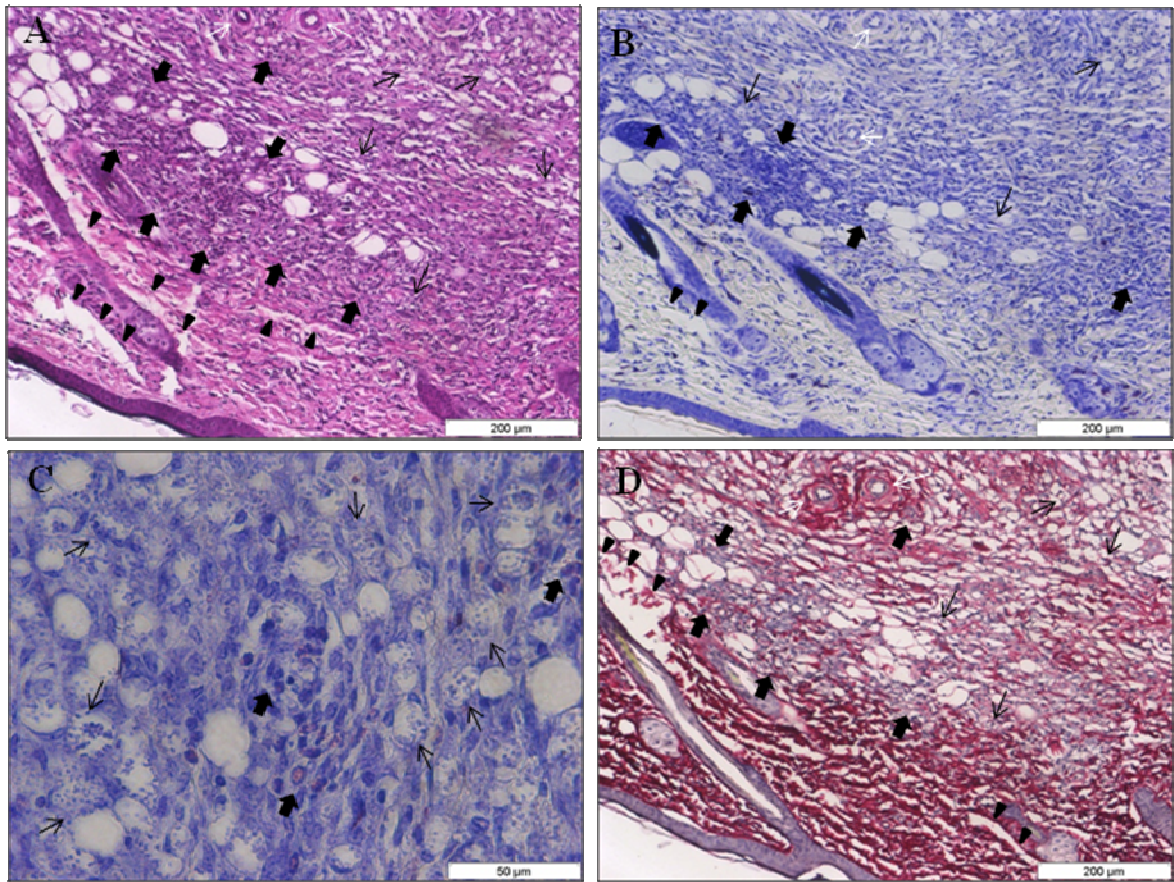


Figura 4.17 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com (-) α -bisabolol 250mg/Kg/dia, após 24 horas de tratamento – Grupo B250. A: Coloração pelo HE – observa-se a presença de vasos sanguíneos (setas brancas), intenso infiltrado inflamatório próximos aos mesmos (seta larga) e intenso parasitismo no tecido (setas), com desagregação das fibras da matriz extracelular (ponta de seta); B e C: Coloração pelo Giemsa de Lennert; B: presença de vasos sanguíneos e intenso infiltrado inflamatório (setas largas) além de grande quantidade de parasitos (setas); C: mostra intenso parasitismo (setas) e infiltrado inflamatório; D: A coloração pela técnica do Picrosirius red demonstrou as fibras de colágeno em desagregação (ponta de seta); devido ao grande processo inflamatório (setas largas) e a presença de parasitos (setas).

Grupo Base – 24 horas após o tratamento.

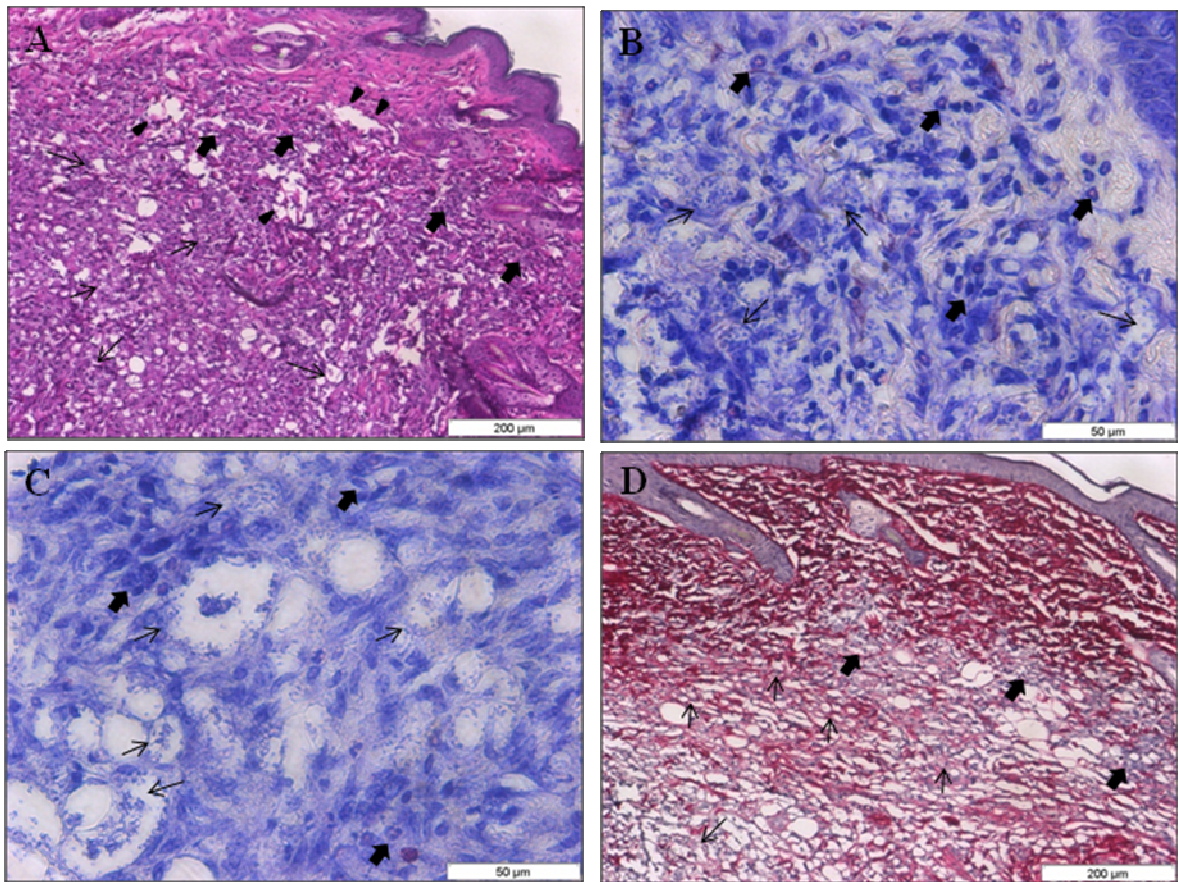


Figura 4.18 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados somente com base (creme Lanette), após 24 horas de tratamento – Grupo Base. A: Coloração de HE – observa-se grande quantidade de parasito no tecido (setas) e infiltrado inflamatório na derme (setas largas), além da desagregação das fibras da matriz extracelular (ponta de seta); B e C: Coloração pelo Giemsa de Lennert; B: observa-se infiltrado inflamatório (setas largas) na derme e grande quantidade de parasitos (setas); C: mostra, na parte mais profunda da lesão, intenso parasitismo (setas) e infiltrado inflamatório; D: A coloração pela técnica do Picrosirius red marca as fibras de colágeno entre as células do processo inflamatório.

Grupo Glu – 24 horas após o tratamento.

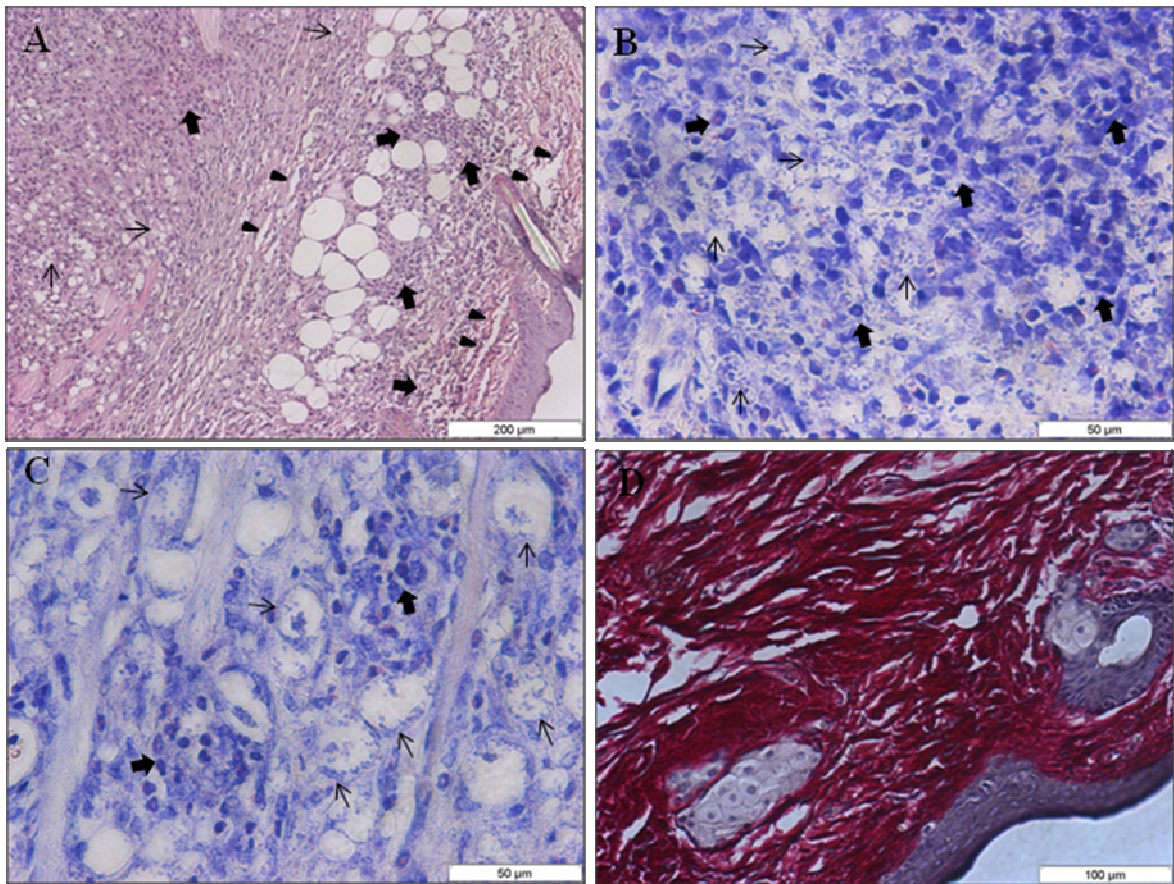


Figura 4.19 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com Glucantime[®], após 24 horas de tratamento – Grupo Glu. A: Coloração de HE - nota-se intenso infiltrado inflamatório (seta larga) com desagregação das fibras da matriz extracelular (ponta de seta) e parasitos (setas); B e C: Coloração de Giemsa; B: intenso infiltrado inflamatório na derme (setas largas) e grande quantidade de parasitos (setas); C: grande quantidade de parasitos (setas) e infiltrado inflamatório constituído, principalmente, por neutrófilos (setas largas); D: A coloração pela técnica do Picrosirius red revelou as fibras de colágeno espessas na epiderme.

Grupo CTRL/INF

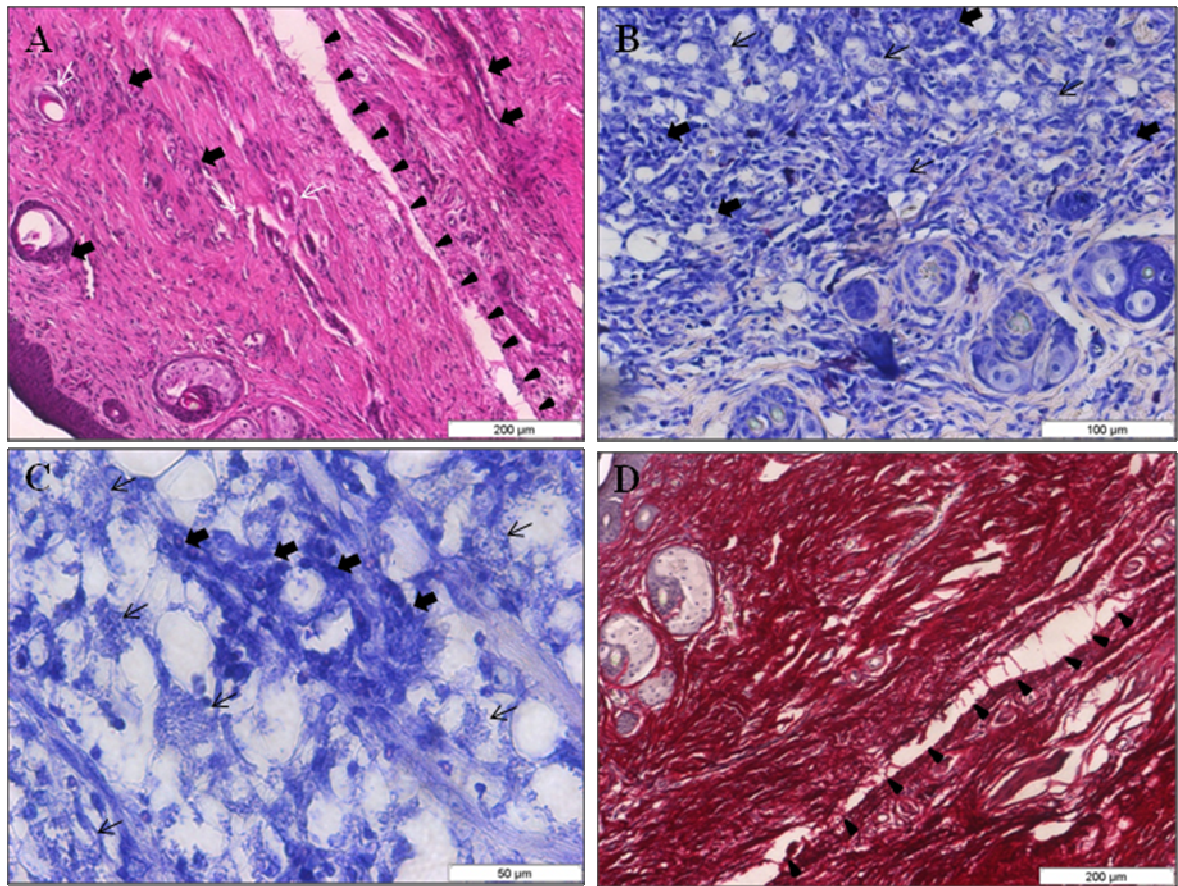


Figura 4.20 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis*, no segundo ponto de necropsia – Grupo CTRL/INF. A: Coloração pelo HE - observamos a presença de vasos sanguíneos (setas brancas) com grande infiltrado inflamatório (setas largas) e com desagregação de fibras de colágeno (ponta da seta); B e C: Coloração pela técnica de Giemsa; B: intenso infiltrado inflamatório na derme (seta larga) e parasitos (seta); C: presença de grande quantidade de parasitos (setas) e infiltrado inflamatório (setas largas); D: A coloração pela técnica do Picrosirius red evidenciou as fibras de colágeno com desagregação das mesmas (ponta da seta).

4.7.3. 7º dia de tratamento

A avaliação histopatológica dos três animais de cada grupo, após 7 dias de tratamento, diferentemente das análises anteriores, evidenciou diversas alterações entre os grupos analisados.

A análise dos animais do grupo B1.000 mostrou, além da diminuição do tamanho da lesão, evidenciada de forma macroscópica, lesões que apresentavam na parte superficial da derme muitos vasos sanguíneos com a presença de grande infiltrado inflamatório e poucos parasitos nesta área da lesão (Fig. 4.21A). Na parte mais profunda da lesão foi possível observar muito infiltrado inflamatório (Fig. 4.21C) e grande quantidade de parasitos (Fig. 4.21B). A coloração pelo Picrosirius red demonstrou na parte mais profunda das lesões, a presença intenso infiltrado inflamatório, além de permitir a marcação de grande quantidade de fibras de colágeno entre as células do processo inflamatório e dos vacúolos parasitóforos na derme (Fig. 4.21D).

Ao analisarmos os animais do grupo B500 não observamos diminuição das lesões de forma significativa. A análise histopatológica destes animais mostrou grande quantidade de parasitos na derme próximos a epiderme, associado a intenso infiltrado inflamatório com presença de exsudato inflamatório na superfície da lesão (Fig 4.22A e B). Na parte mais profunda da lesão observamos, igualmente intenso parasitismo (Fig 4.22C), além da marcação de finas fibras de colágeno destruídas devido a presença do intenso parasitismo e ao processo inflamatório; resultados observados com a técnica do Picrosirius red (Fig. 4.22D).

O resultado da análise do grupo B250 mostrou uma lesão com ainda mais dano, quando comparada com as lesões dos grupos B1.000 e B500. Observamos intenso infiltrado inflamatório com a presença de poucos parasitos na parte superior da derme, além da presença de desagregação das fibras da matriz extracelular (Fig. 4.23A). A avaliação da parte mais profunda da lesão mostrou intenso infiltrado inflamatório, com muita quantidade de parasitos (Fig. 4.23C) e presença de exsudato inflamatório em área necrótica (Fig. 4.23B). Foi possível observar ainda finas fibras de colágeno destruídas, provavelmente, devido ao intenso parasitismo, ao processo inflamatório e à formação de área necrótica (Fig. 4.23D).

Os camundongos do grupo Base apresentaram lesões mais graves do que os animais que foram tratados com (-)- α -bisabolol, nas diferentes concentrações. Foi possível observar grande quantidade de infiltrado inflamatório constituído,

principalmente, por neutrófilos, com desagregação das fibras da matriz extracelular na parte superior da lesão (Fig. 4.24A). Ao examinarmos a parte mais profunda da derme, observamos exsudato inflamatório em área de necrose, com muitos neutrófilos (Fig.4.24B e C). Ainda foi possível observar através da coloração pelo Picrosirius red finas fibras de colágeno destruídas entre as células do processo inflamatório e parasito, além de evidênciação da área de necrose (Fig.4.24D).

A análise histopatológica do grupo Glu mostrou intenso infiltrado inflamatório com desagregação das fibras da matriz extracelular e parasito na parte superior da derme (Fig. 4.25A). A região mais profunda da lesão mostrou intenso parasitismo (Fig. 4.25B e C), com a presença de finas fibras de colágeno destruídas, localizadas entre os parasitos e os infiltrados inflamatórios (Fig. 4.25D). Entretanto, os animais tratados com o Glucantime[®] apresentaram menos danos que os animais do grupo B250 e os dos grupos Base e CTRL/INF, após 7 dias de tratamento.

Ao analisarmos o grupo CTRL/INF não vimos diferença histopatológica entre os animais deste grupo e os do grupo Base, mostrando que os dois grupos possuíam lesões graves. Observou-se a presença de muitos parasitos associados à grande infiltrado inflamatório, o que causou uma desorganização na arquitetura do tecido (Fig. 4.26A). Além disso, foi possível evidenciar, na parte mais profunda da lesão, intenso parasitismo com células inflamatórias (Fig. 4.26B e C) e fibras de colágeno completamente destruídas, entre os inúmeros parasitos e grande área de necrose (Fig. 4.26D).

Os animais do grupo NI/B1.000 e NI/NT, novamente não mostraram nenhuma alteração na derme e epiderme, apresentando características normais (dados não mostrados).

Grupo B1.000 – 7 dias após o tratamento.

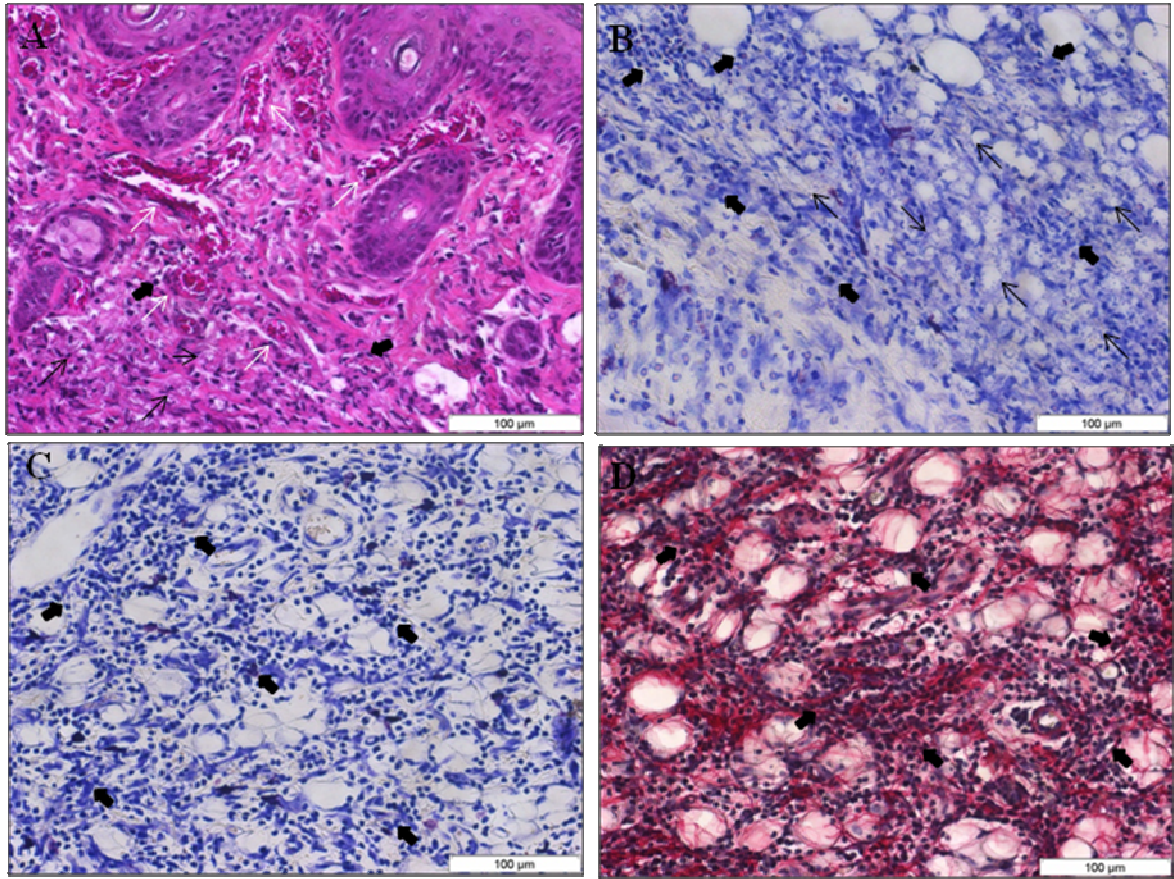


Figura 4.21 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com (-) α -bisabolol 1.000mg/Kg/dia, após 7 dias de tratamento – Grupo B1.000. A: Coloração pela técnica de HE mostrando a presença de muitos vasos sanguíneos (seta branca) com grande infiltrado inflamatório (seta larga), e a presença de poucos parasitos (setas) na parte superior da derme; B e C: Coloração pelo Giemsa de Lennert; B: infiltrado inflamatório (setas largas) e grande quantidade de parasito (seta), região mais profunda da lesão; C: intenso infiltrado inflamatório constituído basicamente por neutrófilos (setas largas); D: Coloração por Picrosirius red evidencia a presença de intenso infiltrado inflamatório (setas largas), além de, permitir a marcação das fibras de colágeno entre as células do processo inflamatório e dos vacúolos parasitários na derme.

Grupo B500 – 7 dias após o tratamento.

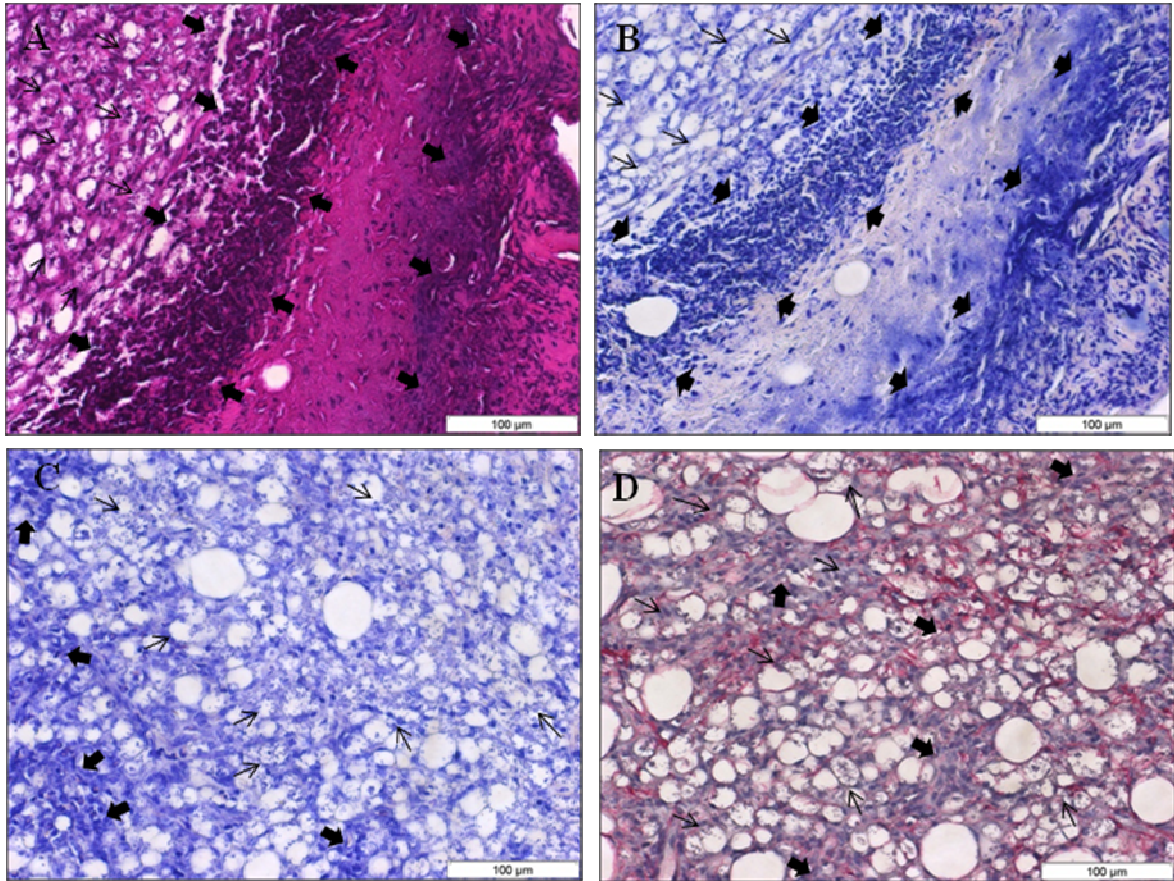


Figura 4.22 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com (-) α -bisabolol 500mg/Kg/dia, após 7 dias de tratamento – Grupo B500. A: Coloração pela técnica de HE demonstrou intenso parasitismo (setas) próximo a epiderme, intenso infiltrado inflamatório (setas largas) com presença de exsudato inflamatório na superfície da lesão; B e C: Coloração pelo método de Giemsa de Lennert; B: grande número de parasitos (setas) próximo da epiderme e intenso infiltrado inflamatório (seta larga) com a presença de exsudato inflamatório na superfície da lesão; C: intenso parasitismo (setas) e infiltrado inflamatório (setas largas); D: A coloração pelo Picrosirius red evidenciou a destruição das fibras de colágeno devido ao intenso parasitismo (setas) e ao processo inflamatório (setas largas).

Grupo B250 – 7 dias após o tratamento.

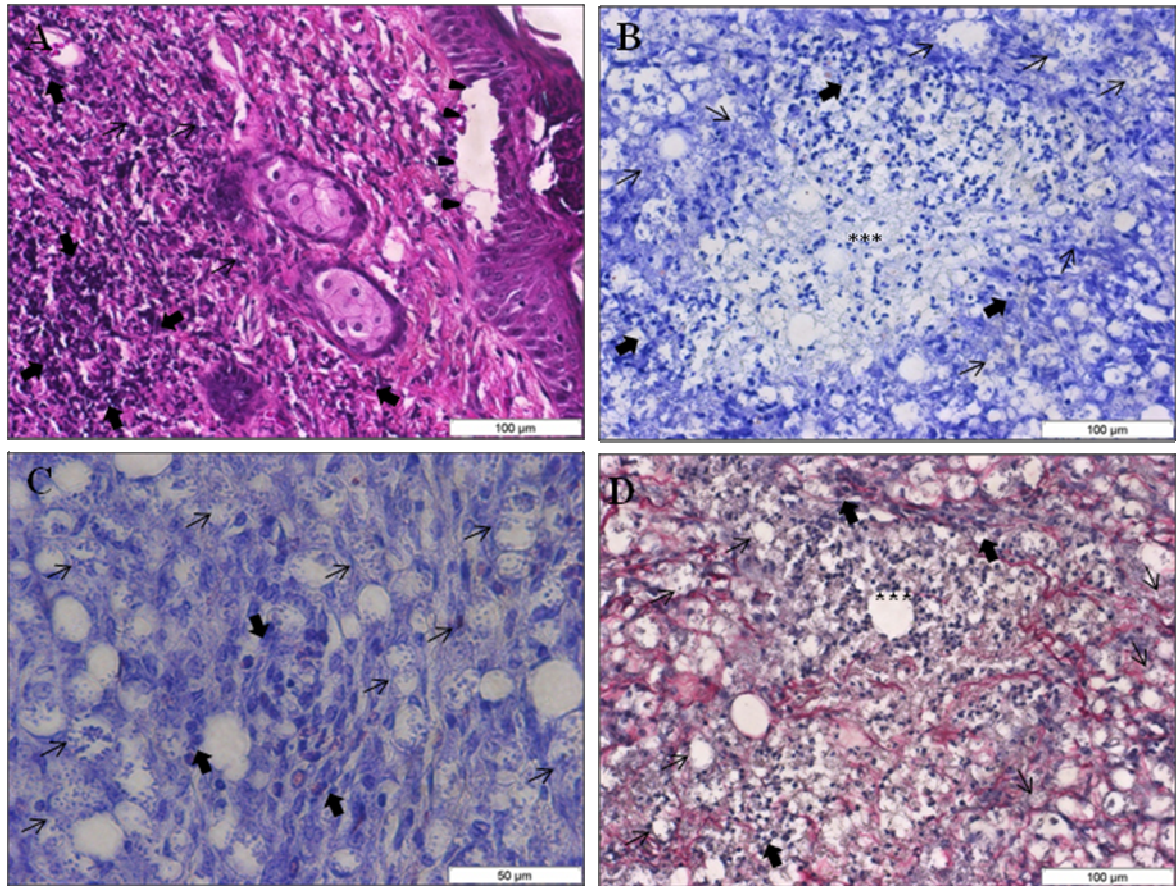


Figura 4.23 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com (-)- α -bisabolol 250mg/Kg/dia, após 7 dias de tratamento – Grupo B250. A: Coloração de HE observa-se intenso infiltrado inflamatório (setas largas) com a presença de poucos parasitos (setas) nesta região, além de desagregação das fibras da matriz extracelular (ponta de seta); B e C: Coloração pela técnica de Giemsa de Lennert; B: presença intenso infiltrado inflamatório (setas largas), grande quantidade de parasitos (setas) e presença de exsudato inflamatório na área necrótica (asterisco), parte mais profunda da lesão; C: presença de grande quantidade de parasitos (setas) e de infiltrado inflamatório, contendo neutrófilos e eosinófilos (setas largas); D: A coloração pela técnica do Picrosirius red mostrou finas fibras de colágeno destruídas, devido ao intenso parasitismo (setas), ao processo inflamatório (setas largas) e à formação de área necrótica (asterisco).

Grupo Base – 7 dias após o tratamento.

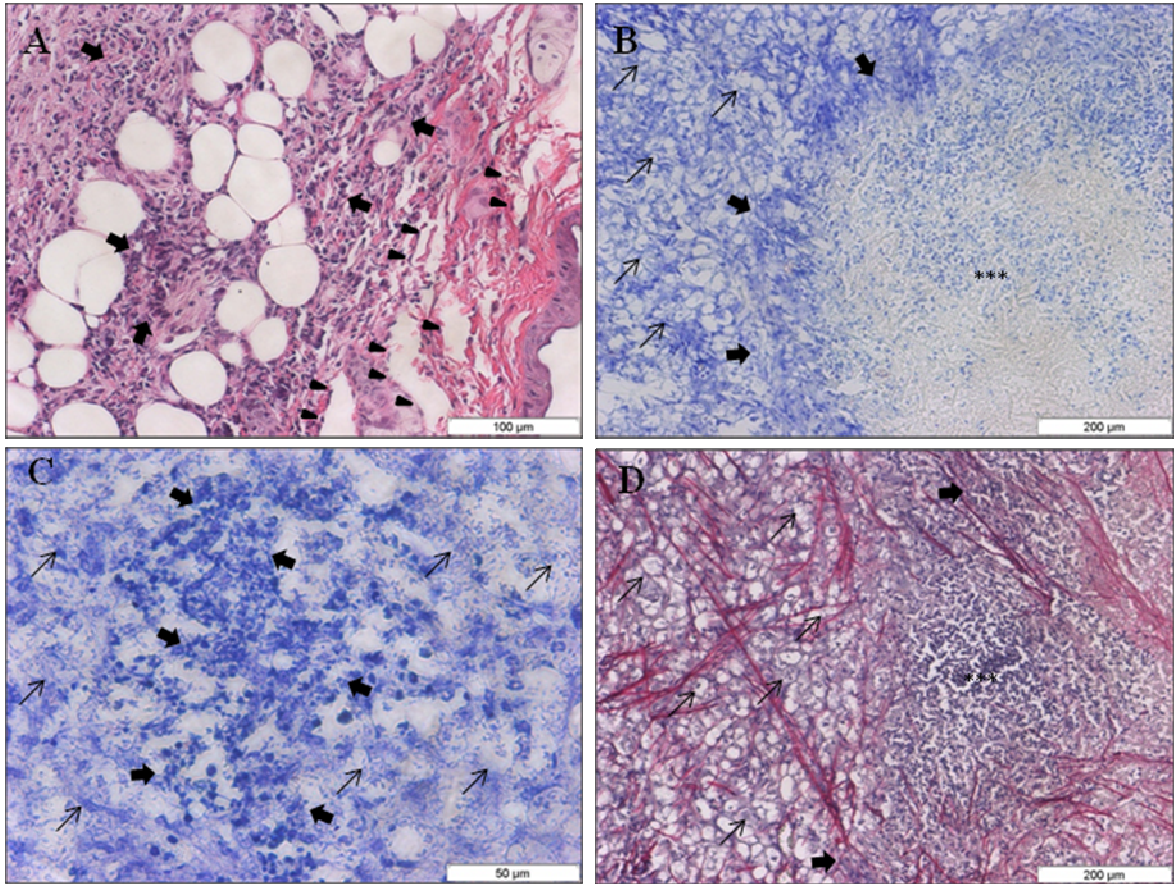


Figura 4.24 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados somente com base (creme Lanette), após 7 dias de tratamento – Grupo Base. A: Coloração pelo HE mostra grande quantidade de infiltrado inflamatório (setas largas) e desagregação das fibras da matriz extracelular (ponta de seta); B e C: Coloração pela técnica de Giemsa; B: na parte profunda da derme, foi possível observar grande área de necrose com piócitos (asterisco), além da presença de parasito ao redor (setas) e células inflamatórias (setas largas); C: intenso infiltrado inflamatório constituído, principalmente, por neutrófilos (setas largas), além da presença de parasitos (setas); D: A coloração pela técnica do Picrosirius red evidenciou finas fibras de colágeno destruídas entre as células do processo inflamatório (setas largas) e parasitos (setas), além de evidenciar a área de necrose (asterisco).

Grupo Glu – 7 dias após o tratamento.

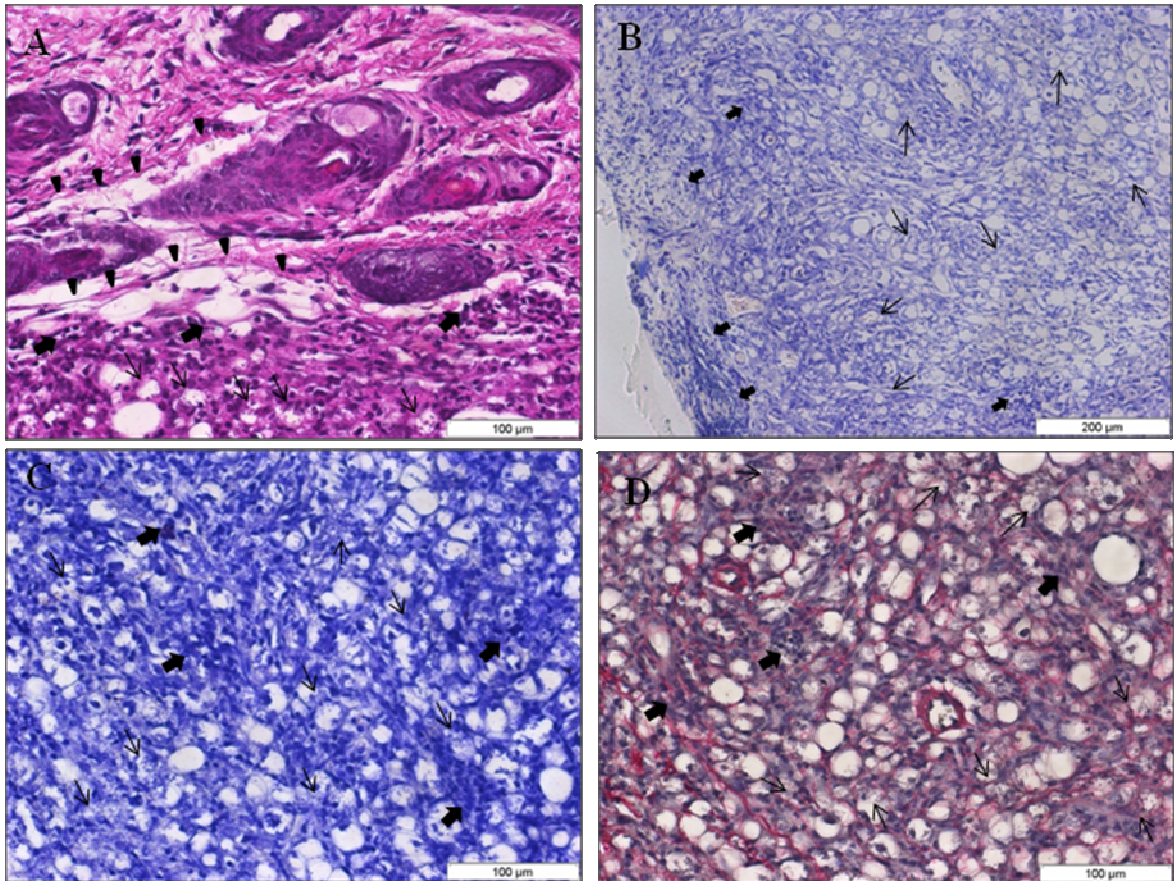


Figura 4.25 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com Glucantime[®], após 7 dias de tratamento – Grupo Glu. A: Coloração pelo HE mostra intenso infiltrado inflamatório (setas largas) com desagregação das fibras da matriz extracelular (ponta de seta) e parasitos (setas); B e C: Coloração por Giemsa; B: presença de intenso parasitismo (setas) com células inflamatórias na região mais superficial da lesão; C: na parte mais profunda da lesão, intenso parasitismo (setas) com a presença de infiltrado inflamatório (setas largas); D: A coloração pela técnica do Picrosirius red mostrou finas fibras de colágeno localizadas entre os parasitos (setas) e os infiltrados inflamatórios (setas largas).

Grupo CTRL/INF

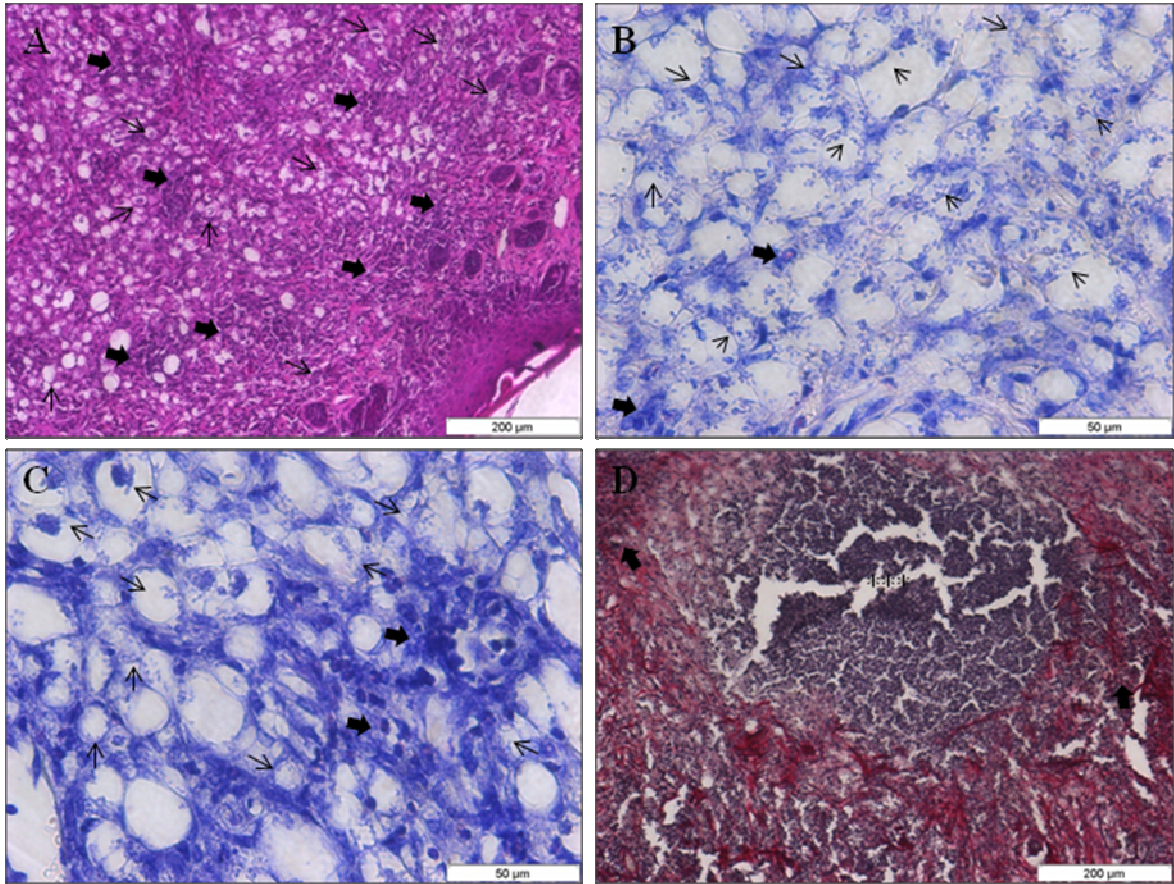


Figura 4.26 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis*, no terceiro ponto de necropsia – Grupo CTRL/INF. A: Coloração HE, observamos intenso parasitismo (setas) com grande infiltrado inflamatório (setas largas) o que causou um desorganização na arquitetura do tecido; B e C: A coloração pela técnica de Giemsa evidenciou, na parte mais profunda da lesão, intenso parasitismo (setas) células inflamatórias (setas largas) contendo basicamente neutrófilos e alguns eosinófilos; D: A coloração pela técnica do Picrosirius red evidenciou fibras de colágeno entre os inúmeros parasitos (setas) e os infiltrados inflamatórios, além de evidenciar área necrótica (asterisco).

4.7.4. 14º dia de tratamento

Após 14 dias de tratamento as diferenças entre os grupos se tornaram ainda mais evidentes. Durante o tratamento, os animais dos grupos tratados com (-)- α -bisabolol, nas três diferentes concentrações, apresentaram melhora macroscópica da lesão. Foi possível observar a diminuição do tamanho das lesões, além do desaparecimento total da infecção secundária na parte superficial da lesão. Estes resultados foram, principalmente, notados nos animais do grupo B1.000, onde todos demonstraram uma melhora homogênea. Contudo, apesar dos animais dos grupos B500 e B250 demonstrarem uma melhora das lesões com a diminuição do inchaço local e o desaparecimento da infecção secundária na parte superficial da lesão, visão macro da lesão, esta melhora não se apresentou de forma homogênea.

Contudo, os animais dos grupos Base, Glu e CTRL/INF mostraram uma piora progressiva das lesões, demonstrando aumento do edema local e aumento da formação de exsudato inflamatório, na parte ulcerada das lesões. Já os animais do grupo NI/B1.000, que não foram infectados, mas foram tratados, não apresentaram nenhuma reação inflamatória como: edema, rubor ou aumento de temperatura no local de tratamento, mostrando que não houve alteração macroscópica que pudesse estar relacionada ao tratamento tópico. Além disso, os animais do grupo NI/NT, não infectados e não tratados, também se mantiveram sem nenhuma alteração.

Ao analisarmos a histopatologia dos animais do grupo B1.000 verificamos que a maioria dos animais analisados apresentavam fibras mais compactadas, sem alterações da epiderme e da parte superior da derme, sugerindo uma possível reparação e/ou cicatrização (Fig. 4.27A e C). Entretanto, na derme mais profunda foi possível observar diversos focos de macrófagos vacuolizados contendo parasitos e infiltrado inflamatório, contendo, principalmente, neutrófilos e eosinófilos (Fig. 4.27B e D). Através da coloração pelo Picrosirius red observou-se largas fibras de colágeno mostrando uma tentativa de reparação da lesão (Fig. 4.28A). Contudo, vimos que havia ainda, na derme mais profunda, além das fibras de colágeno, células inflamatórias e focos de parasitos (Fig. 28B).

Ao analisarmos os animais do grupo B500 observamos diversas diferenças, ao comparar este grupo com o grupo B1.000. Observou-se grande infiltrado inflamatório e intenso parasitismo, que causaram uma desorganização estrutural da derme, muito

próximo da epiderme (Fig. 4.29A e C). Ao analisarmos a parte mais profunda da lesão, observamos, novamente, intenso parasitismo com presença de infiltrado inflamatório (Fig. 4.29B e D). Além disso, verificamos a formação de fibrose em volta de área necrótica com a presença de infiltrado inflamatório em torno desta área (Fig. 4.30B).

A análise dos animais do grupo B250, mostrou danos ainda maiores do que os observados nos animais do grupo B500. Observamos intenso infiltrado inflamatório, principalmente na derme, com desagregação da matriz extracelular e desorganização do tecido (Fig. 4.31A e C). A análise da lesão mais profunda também demonstrou intenso infiltrado inflamatório com presença de muitos parasitos em torno de uma grande área necrótica (Fig. 4.31B). A coloração pelo Giemsa de Lennert demonstrou infiltrado inflamatório na derme e epiderme, fibras pouco compactadas, apresentando vacúolos e demonstrando desagregação do tecido. Além disso, observamos intenso infiltrado inflamatório, inúmeros macrófagos vacuolizados, densamente parasitados (Fig. 4.31D). A coloração pelo Picosirius red mostrou a desagregação da matriz extracelular, com presença de infiltrado inflamatório e focos de parasito na derme (Fig. 4.32A). A análise da parte mais profunda da lesão mostrou fibras de colágeno destruídas devido à presença de área necrótica com intenso infiltrado parasitário ao redor (Fig. 4.32B).

Os animais do grupo Base mostraram aumento progressivo das lesões, apresentando ainda aumento da infecção secundária, provavelmente causada por bactérias, na parte ulcerada das lesões. A análise histopatológica dos animais deste grupo mostrou intenso infiltrado inflamatório, com desagregação da matriz extracelular e desorganização do tecido (Fig. 4.33A e C), sendo possível observar ainda a presença de exsudato inflamatório na borda da lesão (Fig. 4.33C). A análise da lesão na parte mais profunda mostrou, igualmente intenso parasitismo (Fig. 4.33B) e infiltrado inflamatório com inúmeros macrófagos vacuolizados, densamente parasitados e a presença de células polimorfonucleares (Fig. 4.33D). A análise dos tecidos pela coloração pelo Picosirius red foi possível observar, além da desagregação da matriz extracelular (Fig. 4.34A), a destruição da arquitetura do tecido, com rompimento de fibras musculares, provavelmente devido ao intenso parasitismo (Fig. 4.34B).

A análise histopatológica dos animais do grupo Glu mostrou pouca diferença quando comparado aos animais do grupo Base. Foi possível observar a presença de exsudato inflamatório na borda da lesão, desorganização do tecido, devido ao intenso infiltrado inflamatório e ao intenso parasitismo (Fig. 4.35A e C). Ao analisarmos a parte

mais profunda da lesão observou-se intenso parasitismo com inúmeros macrófagos vacuolizados, com muitos parasitos (Fig. 4.35B e D). A coloração pela técnica do Picrosirius red demonstrou fibras de colágeno mal compactadas próximas da epiderme, demonstrando desorganização tecidual, com presença de inúmeros parasitos e infiltrado inflamatório, sendo possível observar a presença de exsudato inflamatório na borda da lesão (Fig.4.36A). A análise mais profunda da lesão, mostrou a destruição da estrutura do tecido provavelmente devido ao intenso parasitismo e infiltrado inflamatório (Fig. 4.36B).

As análises histopatológicas do grupo CTRL/INF mostraram lesões semelhantes às dos grupos Base e Glu, entretanto, com lesões mais significativas que evoluíram durante o experimento. Notou-se intenso parasitismo com grande infiltrado inflamatório o que ocasionou a desorganização na arquitetura do tecido, com desagregação da matriz extracelular (Fig. 4.37A e 4.38A). Além disso, observamos na derme a presença de exsudato inflamatório com inúmeros neutrófilos mortos e a presença de hemorragia local (Fig. 4.37B). A coloração pelo Picrosirius red mostrou fibras de colágeno mal compactadas e destruídas próximas da epiderme, evidenciando desorganização tecidual, com presença de inúmeros parasitos e infiltrado inflamatório, sendo possível observar ainda uma extensa área de exsudato (Fig. 4.38A). Essa coloração possibilitou, também, a observação de vários pontos necróticos com a presença de intenso parasitismo, na parte mais profunda da lesão (Fig. 4.38B).

As análises histopatológicas demonstraram a presença de mastócitos em todos os animais analisados, entretanto, a presença desta célula não se mostrou alterada e nem foi muito frequente.

Grupo B1.000 – 14 dias após o tratamento.

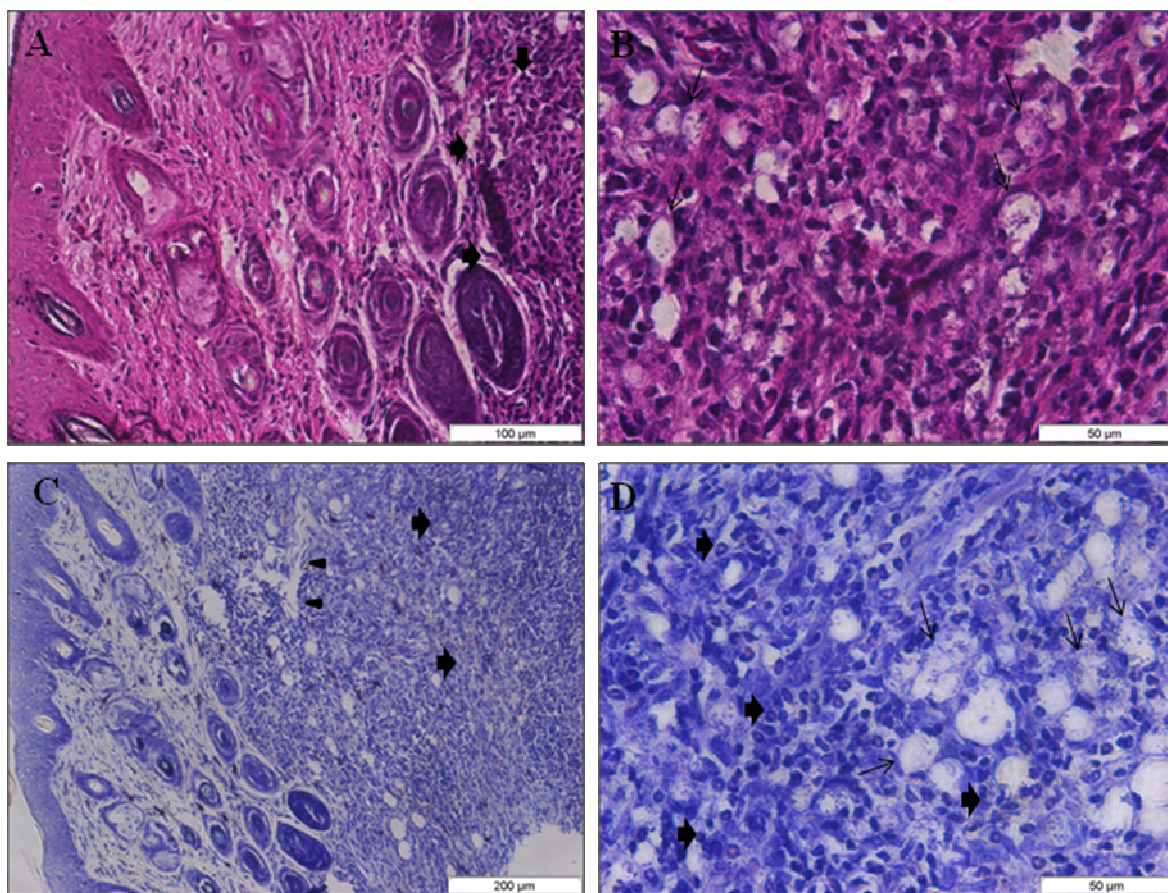


Figura 4.27 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com (-) α -bisabolol 1.000mg/Kg/dia, no 14^o dia de tratamento – Grupo B1.000. A e B: Coloração pela técnica de HE, A: Observa-se epiderme sem alteração, mostrando arquitetura normal, entretanto, na derme mais profunda verificamos a presença de intenso infiltrado inflamatório (setas largas); B: Na parte mais profunda da lesão, foram verificados macrófagos vacuolizados contendo parasitos (setas) e infiltrado inflamatório (setas largas), contendo, basicamente, neutrófilos e eosinófilos; C e D: Coloração pela técnica de Giemsa, C: Observamos a epiderme sem alteração evidente, mostrando arquitetura normal, já na derme foi possível observar intenso infiltrado inflamatório (setas largas), com desorganização da matriz extracelular (ponta de seta); D: Ao analisar a parte mais profunda da lesão observamos diversos focos de parasito (setas) e infiltrado inflamatório (setas largas), contendo, principalmente, neutrófilos e eosinófilos.

Grupo B1.000 – 14 dias após o tratamento.

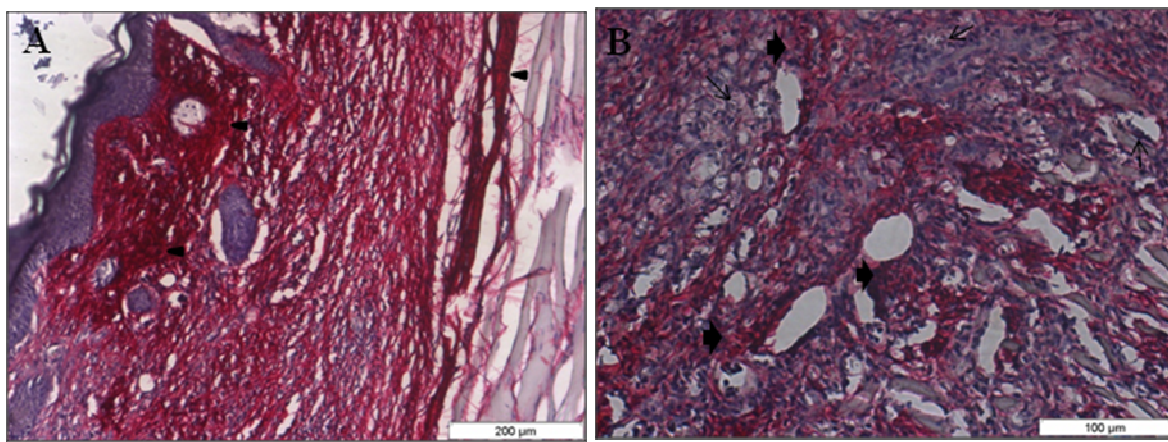


Figura 4.28 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com (-) α -bisabolol 1.000mg/Kg/dia, no 14º dia de tratamento – Grupo B1.000. A e B: Coloração pela técnica do Picrosirius red; A: Observação de largas fibras de colágeno sem alteração da epiderme e na derme (ponta de seta); B: Observação da parte mais profunda da lesão, mostrando as fibras de colágeno entre as células do processo inflamatório (setas largas) e os parasitos (setas) presentes na derme.

Grupo B500 – 14 dias após o tratamento.

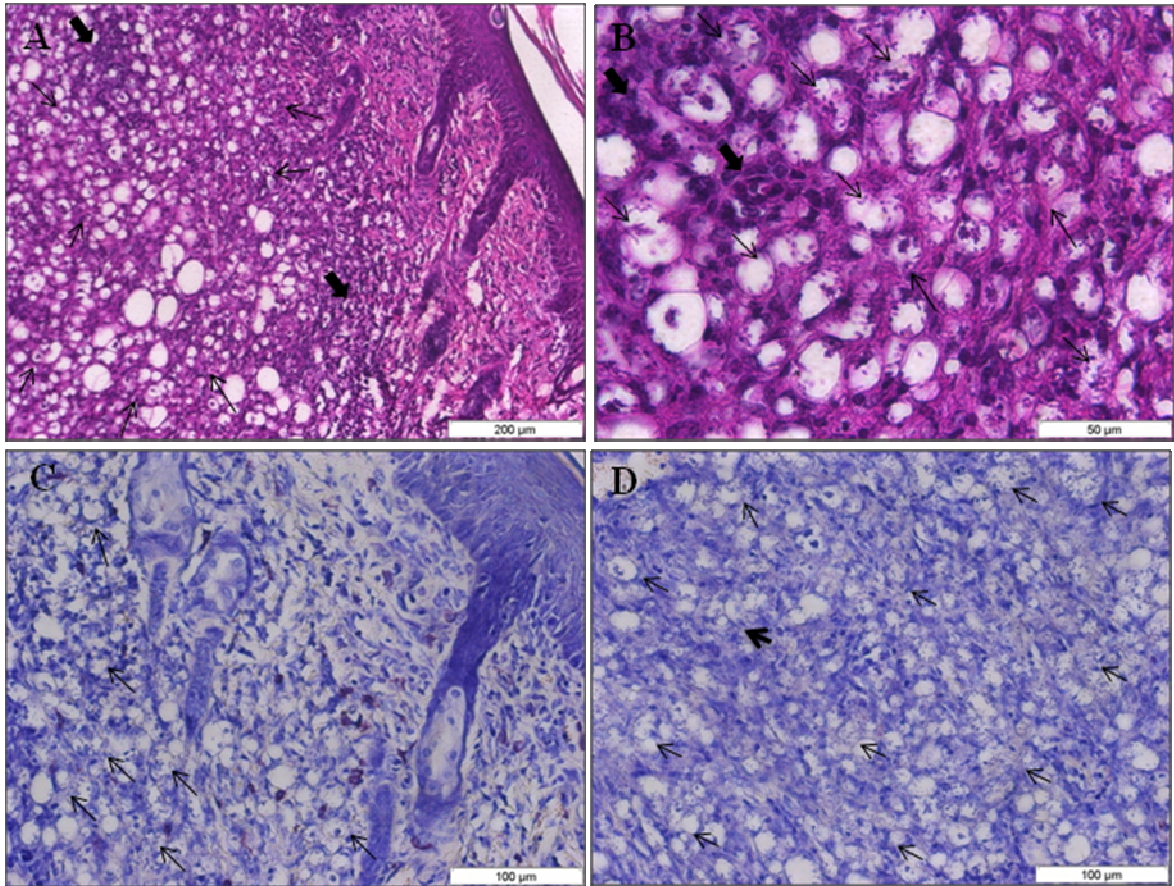


Figura 4.29 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com (-) α -bisabolol 500mg/Kg/dia, no 14^o dia de tratamento – Grupo B500. A e B: Coloração pela técnica de HE, A: Presença de infiltrado inflamatório (setas largas) e intenso parasitismo (setas), causando uma desorganização estrutural da derme, muito próximo da epiderme; B: lesão mais profunda demonstrando, novamente, intenso parasitismo (setas) com presença de infiltrado inflamatório (setas largas) contendo, principalmente, neutrófilos; C e D: coloração pela técnica de Giemsa, C: presença de parasitos (setas) causando desorganização estrutural da derme; D: parte mais profunda da lesão demonstrado intenso parasitismo (setas).

Grupo B500 – 14 dias após o tratamento.

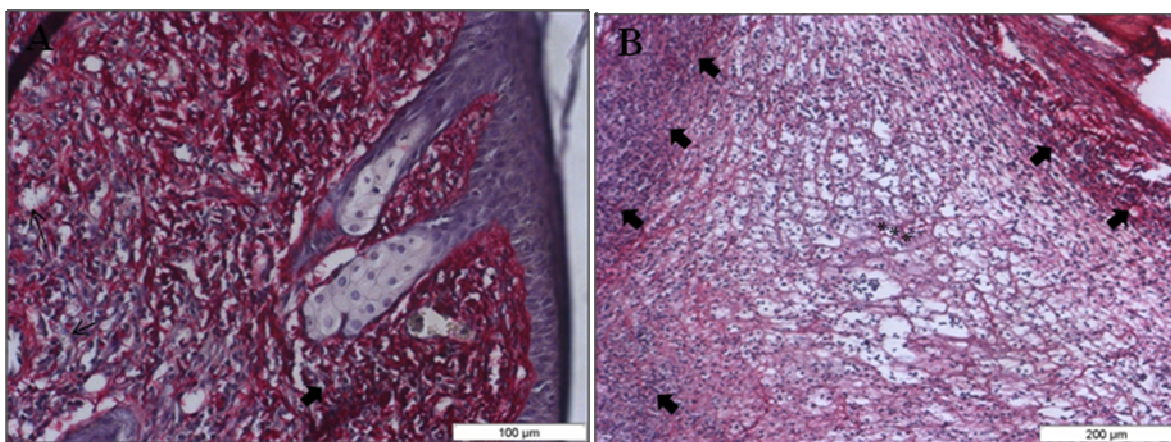


Figura 4.30 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com (-) α -bisabolol 500mg/Kg/dia, no 14^o dia de tratamento – Grupo B500. A e B: Coloração pela técnica do Picrosirius red; A: Observação de largas fibras de colágeno sem alteração muito próximo da epiderme, entretanto, na derme presença de parasitos (setas) e infiltrado inflamatório (setas largas); B: Observação da parte mais profunda da lesão, mostrando a formação de grande área necrótica (asterisco), com a presença de inflamatório em torno.

Grupo B250 – 14 dias após o tratamento.

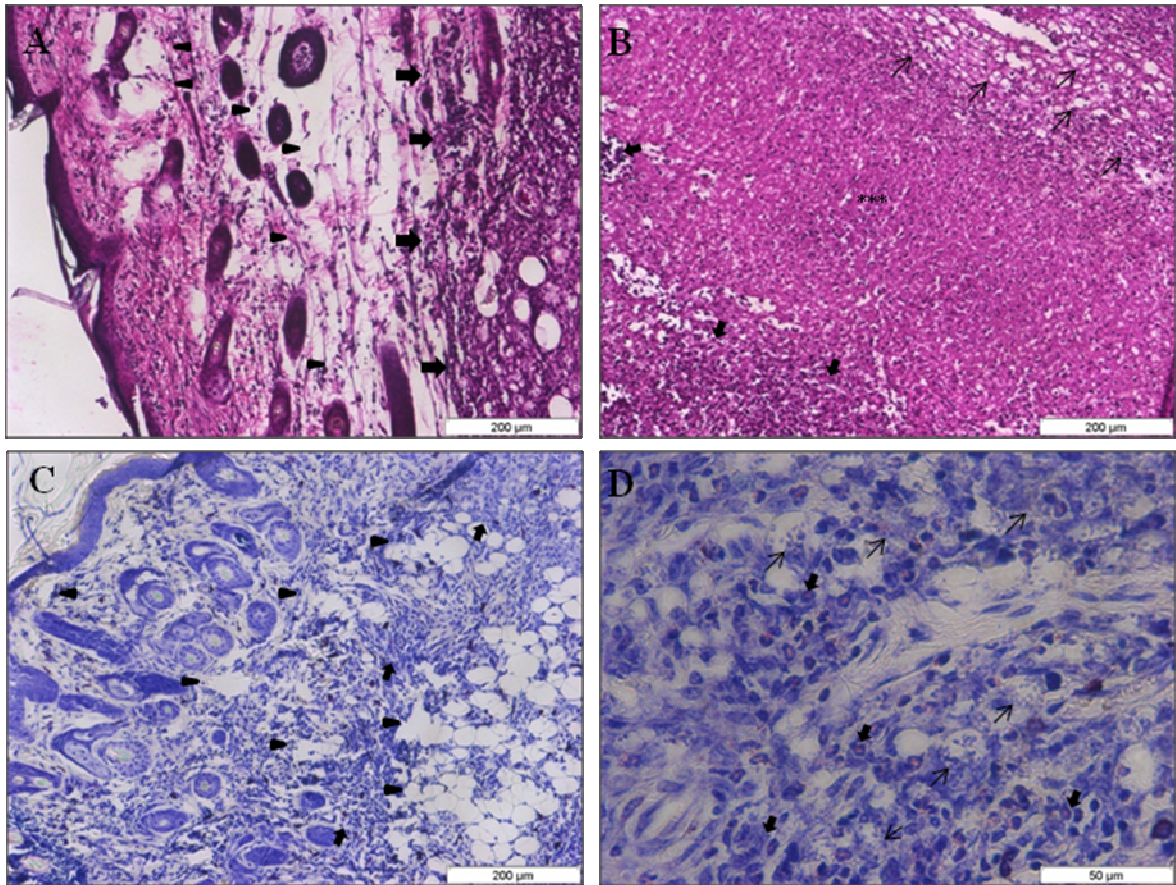


Figura 4.31 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com (-) α -bisabolol 250mg/Kg/dia, no 14^o dia de tratamento – Grupo B250. A e B: Coloração pela técnica de HE, A: Presença de intenso infiltrado inflamatório (setas), principalmente na derme, com desagregação da matriz extracelular (ponta de seta) e desorganização do tecido; B: lesão mais profunda demonstrando intenso infiltrado inflamatório (setas largas) com presença de muitos parasitos (setas) em torno da grande área necrótica (asterisco); C e D: coloração pela técnica do Giemsa de Lennert, C: presença de infiltrado inflamatório na derme e epiderme (seta larga), fibras pouco compactadas apresentando vacúolos, demonstrando desorganização do tecido; D: parte mais profunda da lesão demonstrando intenso infiltrado inflamatório, inúmeros macrófagos vacuolizados, densamente parasitados, além da presença de muitos eosinófilos e neutrófilos (setas largas).

Grupo B250 – 14 dias após o tratamento.

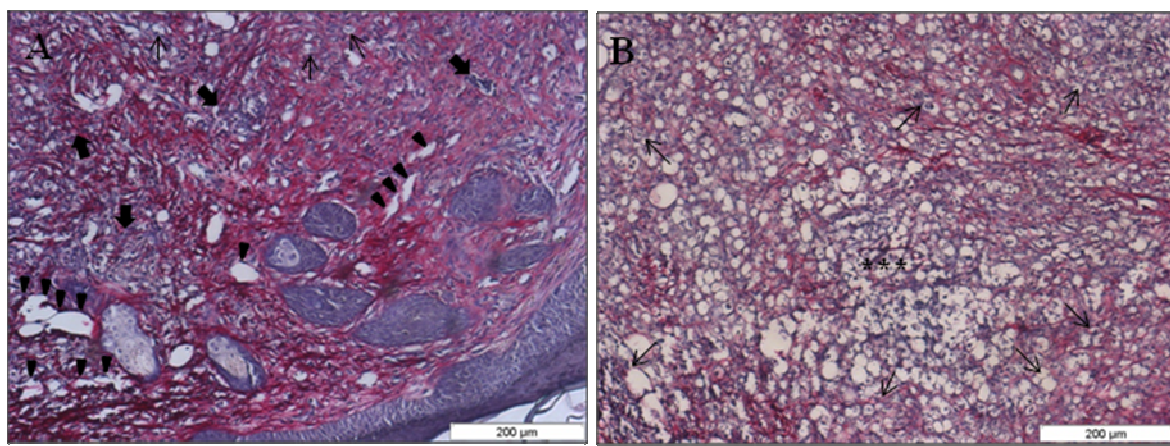


Figura 4.32 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com (-) α -bisabolol 250mg/Kg/dia, no 14^o dia de tratamento – Grupo B250. A e B: Coloração pela técnica do Picrosirius red; A: Observação de desagregação da matriz extracelular (ponta de seta), presença de infiltrado inflamatório (setas largas) e observação de parasitos na derme mais profunda (setas); B: A análise mais profunda da lesão, mostrou a formação de área necrótica (asterisco) com a presença de muito parasitos em torno (setas).

Grupo Base – 14 dias após o tratamento.

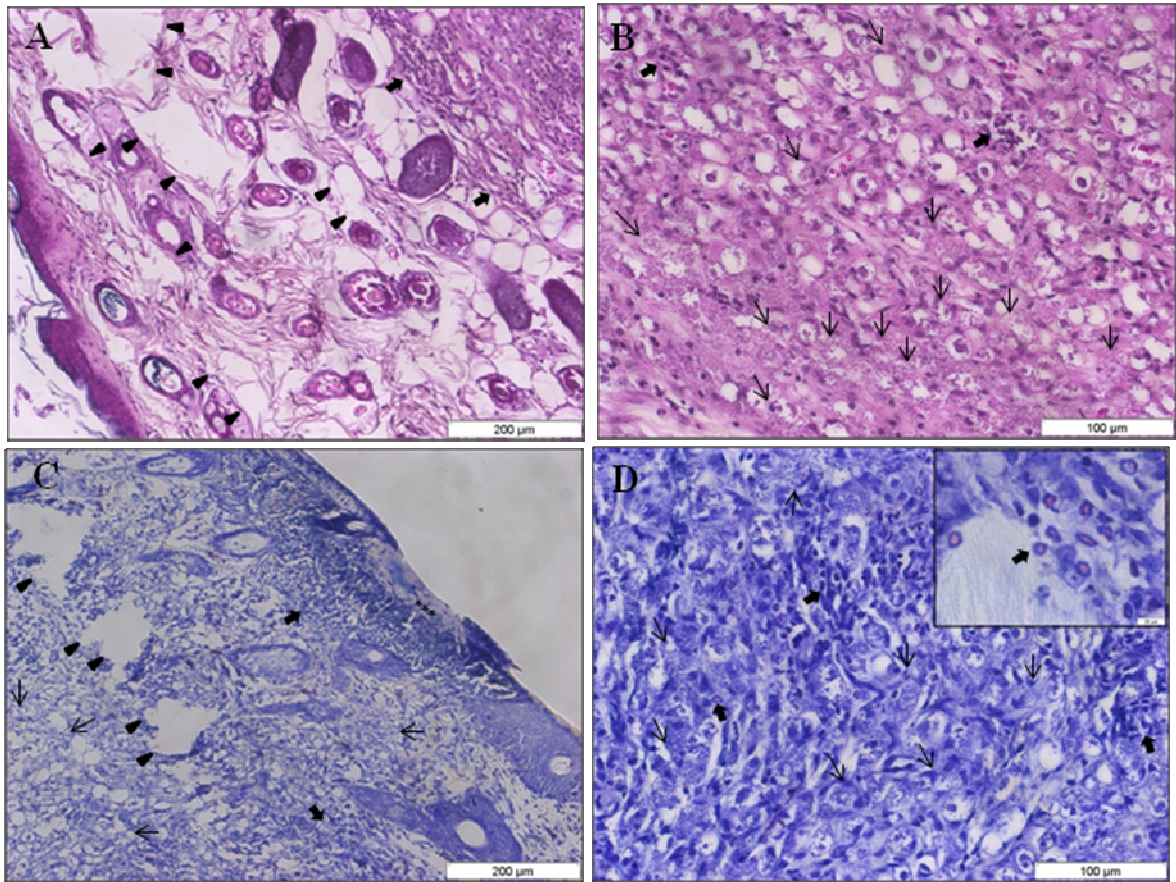


Figura 4.33 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com base, creme Lanette, no 14º dia de tratamento – Grupo Base. A e B: Coloração pela técnica de HE, A: presença de intenso infiltrado inflamatório (setas largas), principalmente na derme, com desagregação da matriz extracelular (ponta de seta) e desorganização do tecido; B: A análise da lesão mais profunda demonstrou intenso parasitismo (setas) e infiltrado inflamatório (setas largas); C e D: Coloração pela técnica de Giemsa de Lennert, C: presença de infiltrado inflamatório na derme e epiderme (setas largas) com lesão ulcerada (asterisco), fibras pouco compactadas apresentando vacúolos (ponta de seta), demonstrando desagregação do tecido; D: A análise da parte mais profunda da lesão demonstrou infiltrado inflamatório (setas largas) e inúmeros macrófagos vacuolizados densamente parasitados (setas), além da presença de eosinófilos, em maior aumento.

Grupo Base – 14 dias após o tratamento.

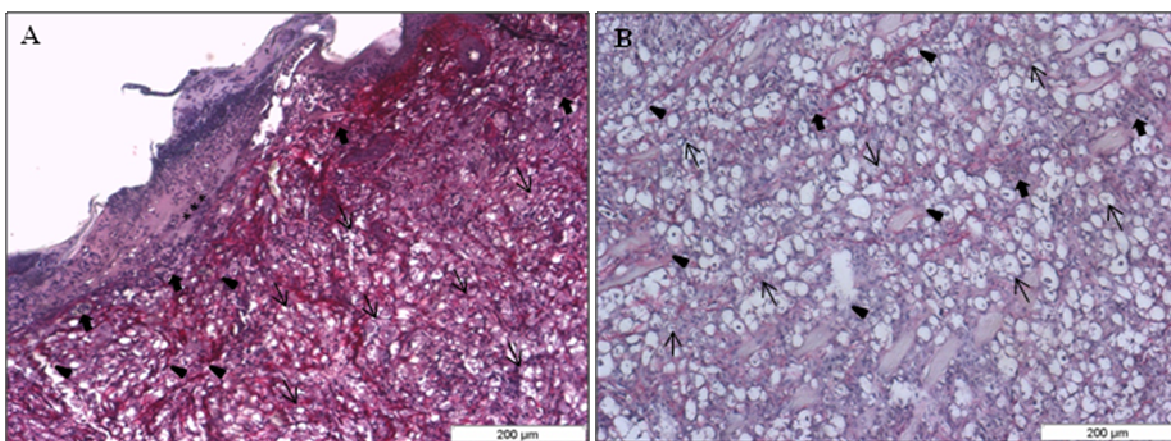


Figura 4.34 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com base, creme Lanette, no 14º dia de tratamento – Grupo Base. A e B: Coloração pela técnica do Picrosirius red; A: Foi possível observar a desagregação da matriz extracelular (ponta de seta), a presença de infiltrado inflamatório (setas largas) e intenso parasitismo (setas), além da observação de exsudato inflamatório na borda da lesão (asterisco); B: A análise mais profunda da lesão mostrou a destruição da estrutura do tecido, com rompimento de fibras musculares e de fibras de colágeno (ponta de seta) devido ao intenso parasitismo (setas).

Grupo Glu – 14 dias após o tratamento.

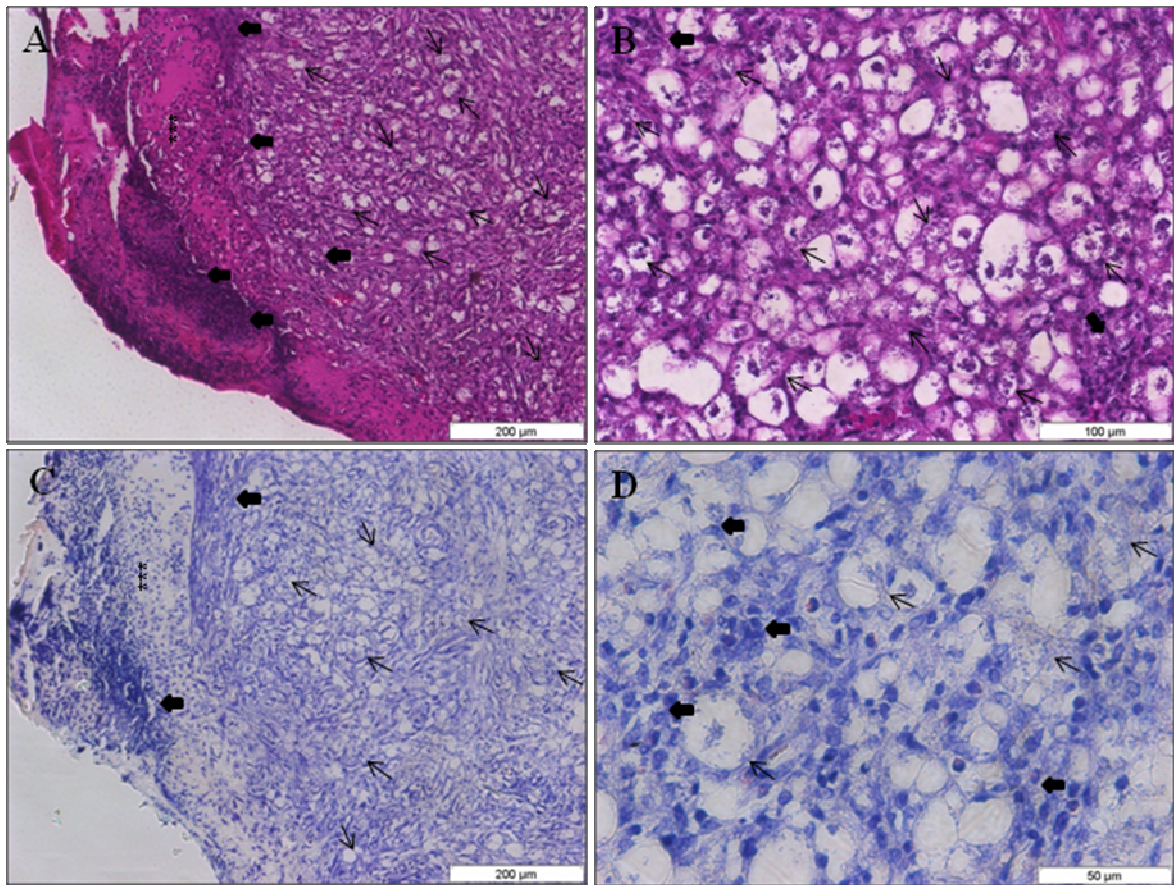


Figura 4.35 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados subcutaneamente com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com Glucantime[®], após 14 dias de tratamento – Grupo Glu. A e B: Coloração pela técnica de HE, A: presença de exsudato inflamatório na borda da lesão (asterisco), desorganização do tecido devido ao intenso infiltrado inflamatório (seta larga) e ao intenso parasitismo (seta); B: A análise da parte mais profunda da lesão mostrou intenso parasitismo (setas) e infiltrado inflamatório (setas largas); C e D: Coloração pela técnica de Giemsa de Lennert, C: observa-se novamente a presença de intenso parasitismo (setas) e exsudato inflamatório em lesão ulcerada (asterisco), contendo também muitas células inflamatórias (setas largas); D: mostra infiltrado inflamatório (seta larga), inúmeros macrófagos vacuolizados, com muitos parasitos (seta), na parte mais profunda da lesão.

Grupo Glu – 14 dias após o tratamento.

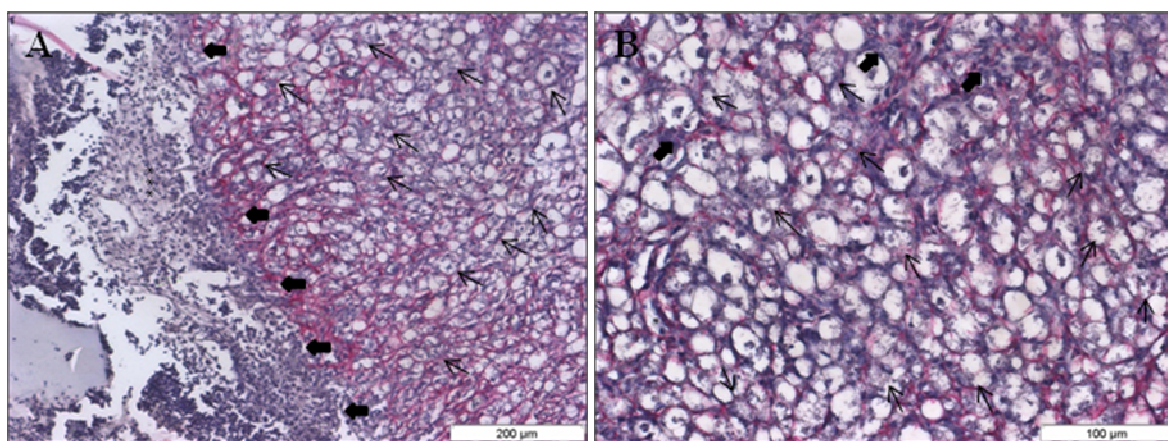


Figura 4.36 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com Glucantime[®], após 14 dias de tratamento – Grupo Glu. A e B: Coloração pela técnica do Picrosirius red; A: observa-se fibras de colágeno mal compactadas próximas da epiderme, demonstrando desorganização tecidual, com presença de inúmeros parasitos (setas) e infiltrado inflamatório (setas largas), podendo observar ainda exsudato inflamatório na borda da lesão (asterisco); B: A análise mais profunda da lesão, mostrou a destruição da estrutura do tecido devido ao intenso parasitismo (setas) e infiltrado inflamatório (setas largas).

Grupo CTRL/INF

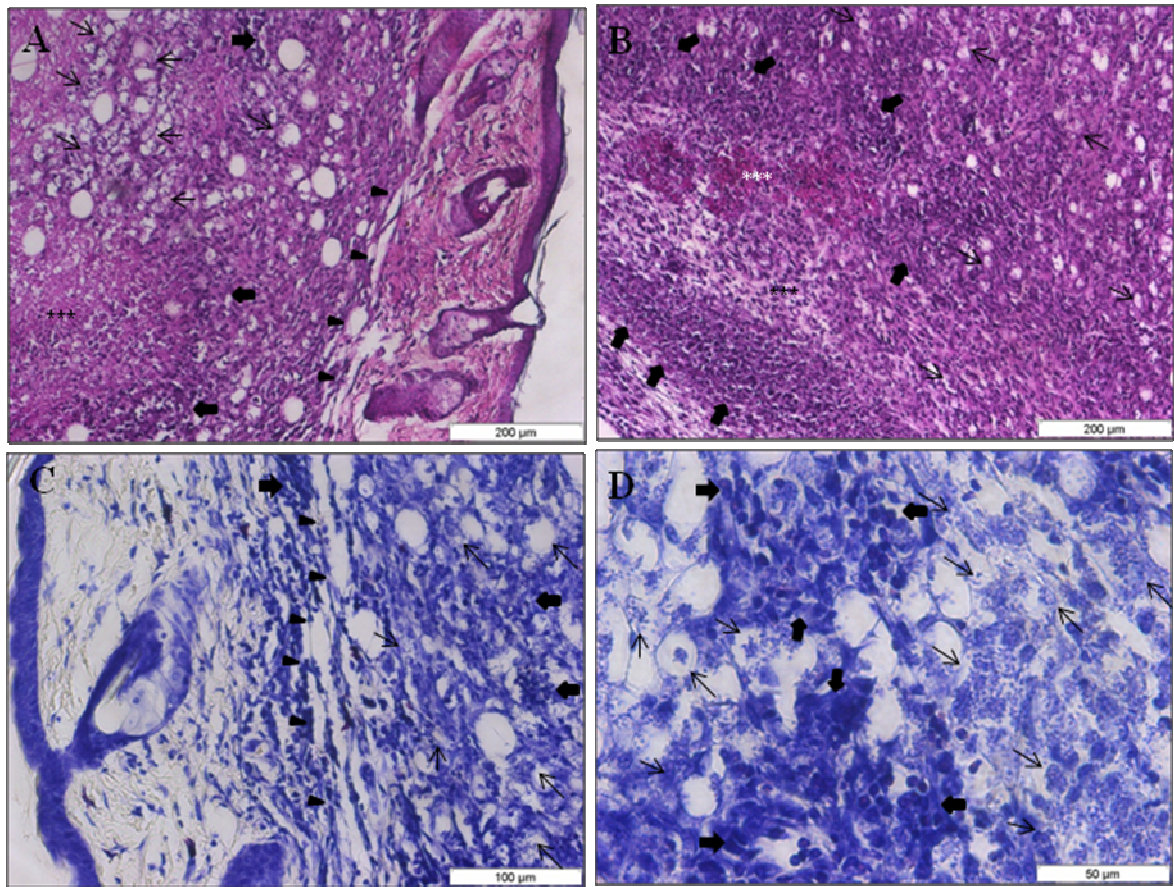


Figura 4.37 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis*, no quinto ponto de necropsia – Grupo 6. A e B: Coloração pela técnica de HE, A: observa-se intenso parasitismo (setas) com grande infiltrado inflamatório (setas largas) o que ocasionou a desorganização na arquitetura do tecido, com desagregação da matriz extracelular (ponta de seta), além da presença de exsudato inflamatório (asterisco); B: A observação da parte mais profunda da lesão mostrou intenso parasitismo (setas), intenso infiltrado inflamatório (setas largas) ao redor do exsudato inflamatório (asterisco), apresentando inúmeros neutrófilos mortos, além da presença de hemorragia local (asterisco branco); C e D: Coloração pela técnica de Giemsa de Lennert, C: presença de intenso parasitismo (setas), células inflamatórias (setas largas) e desagregação da matriz extracelular (ponta de seta); D: A análise da parte mais profunda da lesão demonstrou infiltrado inflamatório (setas largas), inúmeros macrófagos vacuolizados, com intenso parasitismo (setas), além da presença de muitos neutrófilos.

Grupo CTRL/INF

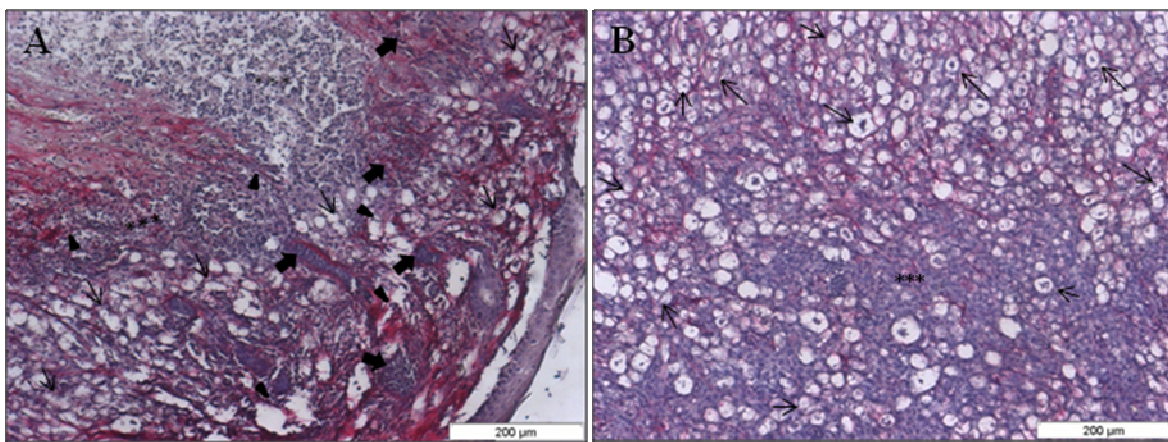


Figura 4.38 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis*, no quinto ponto de necropsia – Grupo CTRL/INF. A e B: Coloração pela técnica do Picrosirius red; A: Foi possível observar grande quantidade de infiltrado inflamatório (setas largas), desorganização na arquitetura do tecido, com presença de desagregação da matriz extracelular (ponta de seta). Além disso, observamos, na derme a presença de grande área necrótica com piócitos (asterisco); B: A análise da parte mais profunda da lesão permitiu a observação de vários pontos necróticos (asterisco) com a presença de intenso parasitismo (setas).

4.7.5. 30° dia de tratamento

Durante os trinta dias de tratamento, os camundongos BALB/c do grupo B1.000 apresentaram uma regressão no tamanho das lesões, que foi acompanhada de fechamento e/ou cicatrização das mesmas, um pouco depois da metade do tratamento. Aproximadamente, no 17º dia após o início do tratamento, as lesões estavam fechadas sem edema no local da infecção, medindo $1,533\pm 0,28\text{mm}$. Entretanto, após dois dias, houve um ligeiro edema local, $1,833\pm 0,25\text{mm}$, que se manteve até o final do experimento. A análise histopatológica do sítio da infecção dos camundongos do grupo B1.000, demonstrou a epiderme íntegra, sem presença de parasito ou infiltrado inflamatório (Fig. 4.39A e C). Entretanto, na derme, na parte mais profunda de lesão, foi possível observar intenso infiltrado inflamatório, com inúmeros macrófagos vacuolizados, densamente parasitados, e polimorfonucleares (Fig. 4.39B e D), sem destruição da arquitetura do tecido. A análise dos cortes corados pelo Picrosirius red revelou que havia produção significativa de fibras de colágeno entre as células do processo inflamatório presentes na derme, sugerindo uma reparação parcial ou cicatrização da lesão (Fig. 4.40A e B).

A análise histopatológica do grupo B500, demonstrou grande diferença quando comparado ao grupo B1.000, apesar desse grupo também ter suas lesões fechadas e/ou cicatrizadas. Aproximadamente, no 17º dia de tratamento, houve um maior aumento no tamanho dessas lesões, quando comparado ao grupo B1.000. Estas lesões cresceram de $2,333\pm 0,77\text{mm}$ para $3,1000\pm 1,67\text{mm}$. A análise histopatológica deste grupo demonstrou que, no interior das lesões, havia intenso infiltrado inflamatório em torno de uma grande área necrótica (Fig. 4.41B). Além disso, havia muitos parasitos próximos à epiderme (Fig. 4.41A e C). Ao analisarmos a parte mais profunda da lesão, observamos intenso parasitismo com intenso infiltrado inflamatório (Fig. 4.41D), e grande presença de polimorfonucleares. A coloração pelo Picrosirius red revelou a produção de fibras de colágeno, entre as células do processo inflamatório na parte superior da derme, mas pode-se notar a desagregação da matriz extracelular (Fig. 4.42A), além de se evidenciar, novamente, uma grande área necrótica na parte mais profunda da lesão (Fig. 4.42B). Apesar de ocorrer a formação de fibras de colágeno na epiderme estas, entretanto, foram menos espessas do que as formadas no grupo B1.000, como tentativa de recuperação da área lesionada.

Os camundongos do grupo B250, assim como os dos grupos B1.000 e B500, também demonstraram cicatrização superficial das lesões, no mesmo período pós tratamento. Contudo, apesar das lesões terem se fechado, havia intenso infiltrado inflamatório e grande parasitismo nestas lesões, o que fez com que elas aumentassem muito de tamanho, de $2,467 \pm 1,42$ para $3,533 \pm 0,35$ mm, resultado que foi confirmado na histologia. Na análise histopatológica deste grupo, observamos intenso infiltrado inflamatório e presença de parasito muito próximo da epiderme e da derme superior, com desagregação da matriz extracelular (Fig. 4.43A e C). Foi possível visualizar a reparação incompleta da epiderme, entretanto, as fibras de colágeno se apresentavam pouco compactadas (Fig. 4.44A), provavelmente, devido ao intenso infiltrado inflamatório e à grande quantidade de parasito (Fig. 4.44A). Já ao analisar a parte mais profunda da derme, observamos intenso parasitismo e intenso infiltrado inflamatório, com presença de grande área de fibrose rodeada de exsudato inflamatório e muitos parasitos (Fig. 4.43B e Fig. 4.43D). Além disso, com a coloração pelo Picrosirius red notou-se, novamente, grande área de fibrose com presença de exsudato inflamatório e muitos parasitos (Fig. 4.44B).

Já os animais do grupo Base demonstraram uma piora progressiva das lesões com aumento de tamanho das mesmas e presença de exsudato inflamatório, provavelmente devido a infecção secundária causada por bactérias. A análise histopatológica desses animais demonstrou intenso infiltrado inflamatório, inúmeros parasitos, tanto na derme profunda quanto na superficial, com presença de focos de hemorragia, próxima aos vasos sanguíneos, além de demonstrar lesão ulcerada e desagregação da matriz extracelular (Fig. 4.45A, 4.45C e 4.46A). Já, ao analisarmos as imagens da parte mais profunda da lesão, observamos, além do infiltrado inflamatório e intenso parasitismo uma grande área de exsudato inflamatório e área necrótica (Fig. 4.45D, 4.45B e 4.46B).

A análise dos animais do grupo Glu, novamente, mostrou semelhanças com os do grupo Base. Entretanto, apesar dos danos causados em ambos terem sido parecidos, houve uma maior tentativa de reparação nos animais do grupo Glu do que no grupo Base. A análise histopatológica do grupo Glu demonstrou intenso infiltrado inflamatório, com desagregação da matriz extracelular na derme superficial, além da presença de parasitos (Fig. 4.47A). A análise da parte mais interna da lesão mostrou intenso parasitismo com poucas células inflamatórias (Fig. 4.47B). Já a observação de

lâminas, coradas pelo método de Giemsa de Lennert, demonstrou em algumas áreas, onde a lesão estava ulcerada, a total destruição da arquitetura do tecido, sendo possível observar extensa área necrótica (Fig. 4.47C). Além disso, foi possível notar, na parte mais profunda da lesão, grande área de exsudato inflamatório, com a presença de infiltrado inflamatório e de parasitos ao redor (Fig.4.47D). Contudo, ao analisarmos as lâminas coradas, pelo Picrosirius red, foi possível notar uma tentativa de recuperação da lesão, pela formação de fibras de colágeno, principalmente na borda da lesão (Fig. 4.48A e B). Entretanto, devido ao intenso parasitismo e ao processo inflamatório não houve uma significativa recuperação da lesão.

Já os animais do grupo CTRL/INF demonstraram graves lesões, com a presença de muito exsudato inflamatório na borda das lesões, provavelmente devido à infecção secundária causada por bactérias. Contudo, o quadro histopatológico dos animais desse grupo foi muito semelhante ao do grupo Base. A análise demonstrou infiltrado inflamatório com a presença de muitos parasitos, além de extenso infiltrado inflamatório, contendo muitos piócitos. Foi possível observar também a total destruição da arquitetura do tecido (Fig. 4.49A e C). A observação de áreas mais internas das lesões permitiu verificar a presença de intenso parasitismo e algumas células inflamatórias como, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos, contudo, sem um aumento significativo no número de mastócitos locais. Além disso, foi possível observar a desorganização da arquitetura normal do tecido, como descrito anteriormente. Outra importante observação, na histopatologia dos animais do grupo CTRL/INF, foi a ausência de vasos sanguíneos evidentes nestas lesões, provavelmente devido à intensidade de parasitos e exsudato inflamatório, que levaram a desorganização e a destruição da arquitetura normal do tecido (Fig. 4.49A, B, C e D e 4.50A e B). Ao analisar as lâminas coradas pelo Picrosirius red foi possível observar, novamente, o intenso parasitismo e a destruição com desagregação da matriz extracelular, na parte superior da derme (Fig. 4.50A). Além disso, observamos grande área necrótica no interior da lesão (Fig. 4.50B).

Entretanto, ao analisar o grupo NI/B1.000, animais não infectados, mas tratados com 1.000mg de (-)- α -bisabolol, observamos o tecido com características normais sem alterações na derme e epiderme após os 30 dias de tratamento (Fig. 4.51A,B,C e D). A coloração pelo Picrosirius red mostrou fibras de colágeno espessas de aspecto normal (Fig. 4.51E e F). Da mesma forma, ao analisarmos o grupo NI/NT, animais controle não

infectados e não tratados, assim como, o grupo NI/B1.000, não observamos nenhuma alteração histopatológica. O tecido apresentou características normais sem alterações na derme e epiderme (Fig. 4.52A, B, C e D). Através da coloração pelo Picrosirius red foi possível demonstrar fibras de aspecto normal (Fig. 4.52E e E).

Grupo B1.000 – 30 dias após o tratamento.

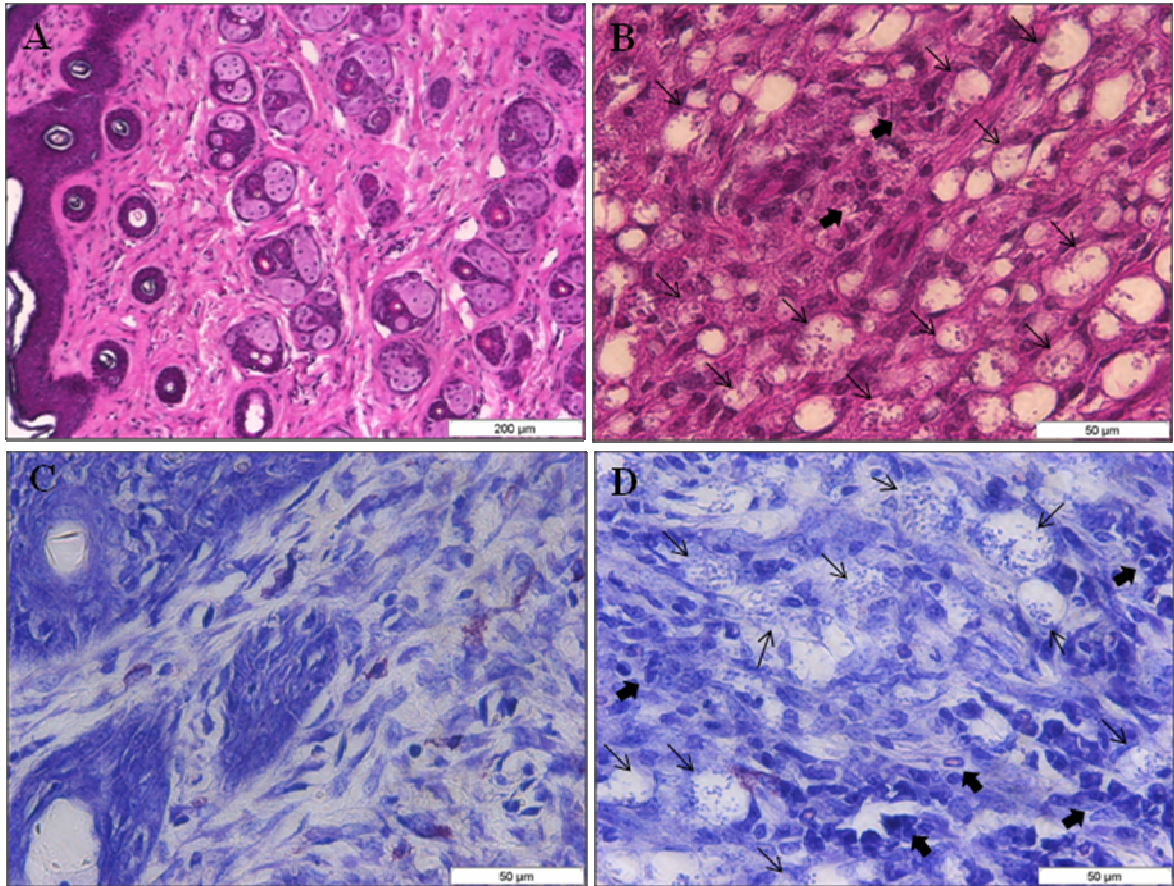


Figura 4.39 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com (-) α -bisabolol 1.000mg/Kg/dia, no 30º dia de tratamento – Grupo B1.000. A e B: Coloração pela técnica de HE; A: A epiderme se mostrou sem alteração evidente, demonstrando arquitetura normal; B: A análise da parte mais profunda da lesão demonstrou grande quantidade de macrófagos vacuolizados com muitos parasitos (setas) e infiltrado inflamatório, constituído, principalmente, por neutrófilos e eosinófilos (setas largas); C e D: Coloração pela técnica de Giemsa de Lennert, C: Epiderme sem alteração evidente, mostrando arquitetura normal; D: Parte mais profunda da lesão mostrando diversos focos com intenso parasitismo (setas) e muito infiltrado inflamatório (setas largas) constituído, principalmente, por neutrófilos e eosinófilos.

Grupo B1.000 – 30 dias após o tratamento.

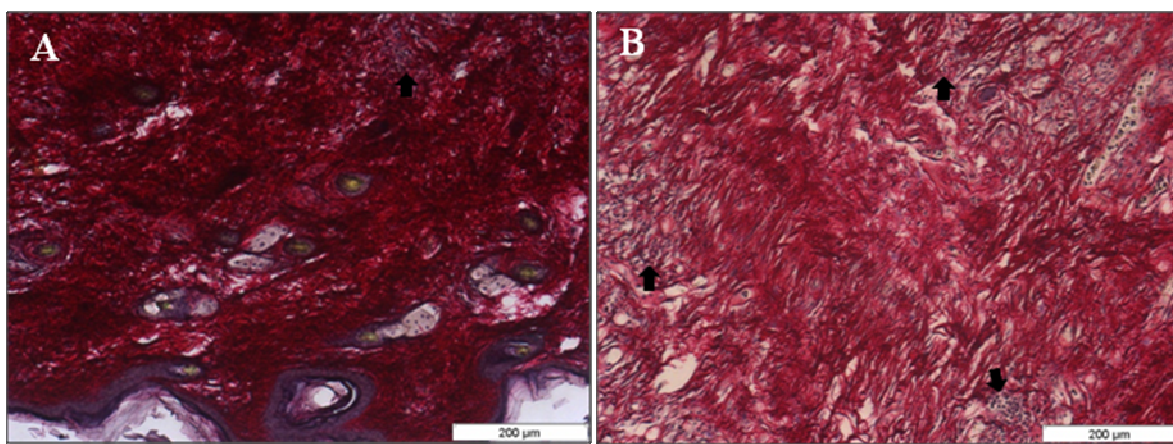


Figura 4.40 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com (-) α -bisabolol 1.000mg/Kg/dia, no 30º dia de tratamento – Grupo B1.000. A e B: Coloração pela técnica do Picrosirius red; A: Foi possível observar grande quantidade de fibras espessas de colágeno, além da presença de infiltrado inflamatório; B: Parte mais profunda da lesão permitiu a observação de fibras espessas de colágeno entre muitos focos de infiltrado inflamatório (setas largas).

Grupo B500 – 30 dias após o tratamento.

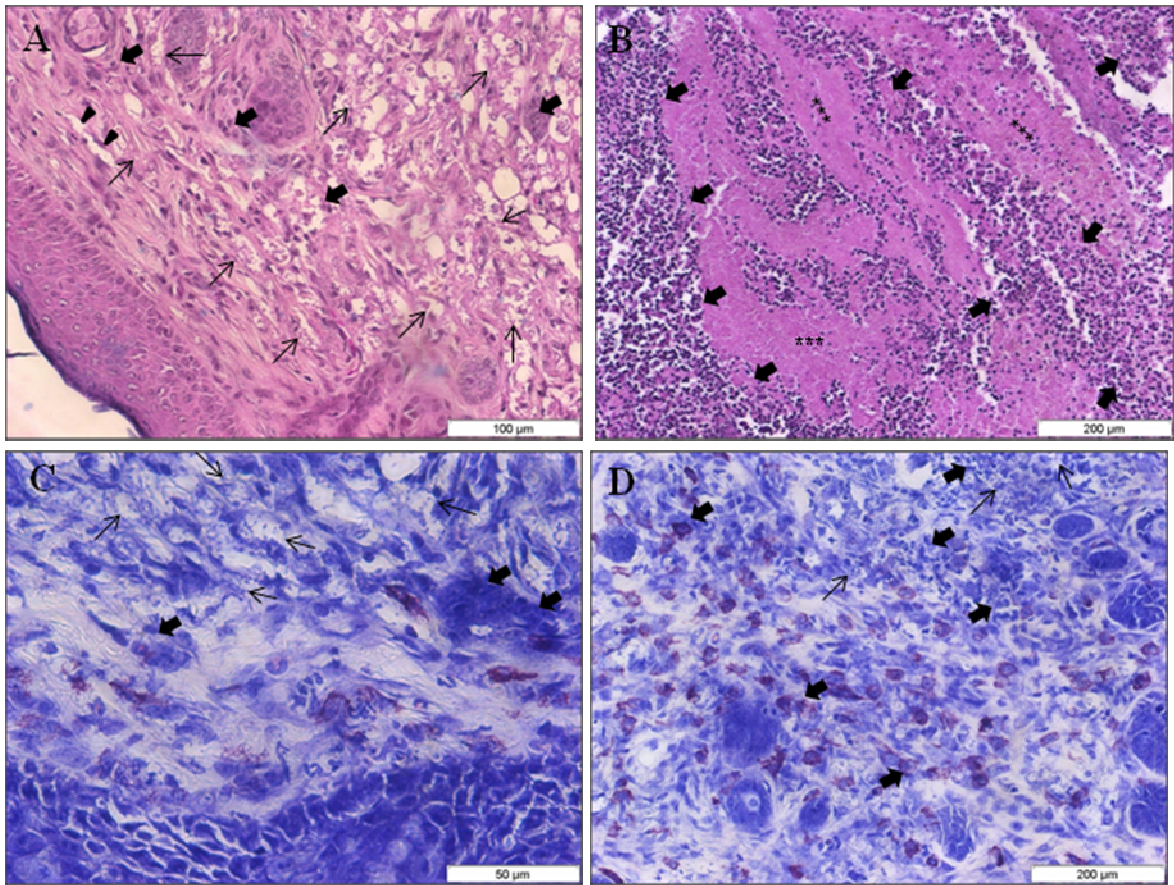


Figura 4.41 - Análise histopatológica de fragmentos da pele da cauda de camundongos BALB/c, infectados subcutaneamente com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com (-) α -bisabolol 500mg/Kg/dia, no 30º dia de tratamento – Grupo B500. A e B: Coloração pela técnica de HE, A: Observa-se a presença de infiltrado inflamatório (setas largas) e parasitos (setas) na derme, muito próximo da epiderme, além da desagregação da matriz extracelular (ponta de seta); B: Lesão mais profunda demonstrando intenso infiltrado inflamatório (setas largas) com presença de exsudato inflamatório, grande área necrótica (asterisco) com presença de piócitos; C e D: Coloração pela técnica de Giemsa de Lennert, C: Notou-se a presença de parasitos (setas) muito próximo da epiderme e infiltrado inflamatório (setas largas), constituído por neutrófilos, eosinófilos e mastócitos; D: A parte mais profunda da lesão mostrou muitos parasitos (setas) com a presença de polimorfonucleares e mastócitos (setas largas).

Grupo B500 – 30 dias após o tratamento.

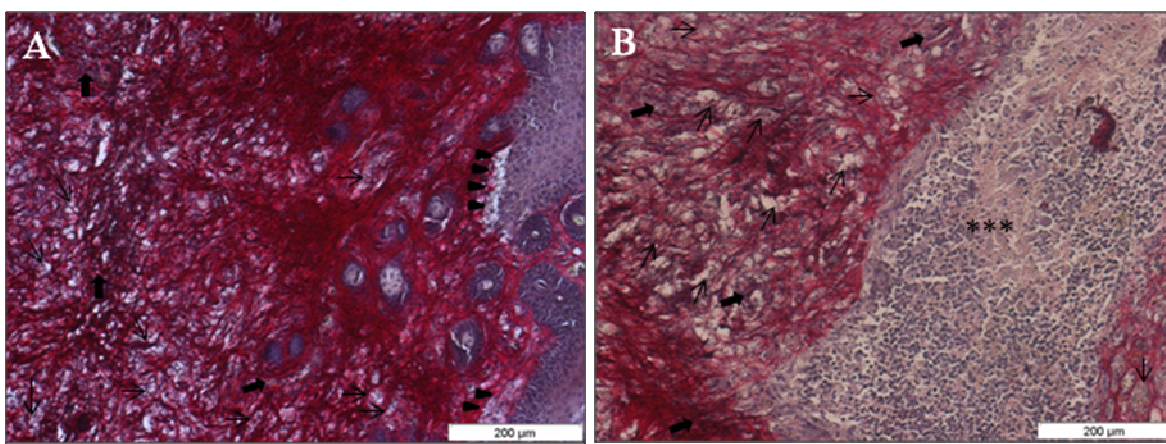


Figura 4.42 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com (-)- α -bisabolol 500mg/Kg/dia, no 30º dia de tratamento – Grupo B500. A e B: Coloração pela técnica do Picrosirius red; A: Infiltrado inflamatório (setas largas), com presença de desagregação da matriz extracelular (pontas de seta). Presença de inúmeros parasitos na derme (setas); B: Parte mais profunda da lesão, observação de grande área de necrose (asteriscos) com a presença de intenso parasitismo (setas) e células inflamatórias (setas largas).

Grupo B250 – 30 dias após o tratamento.

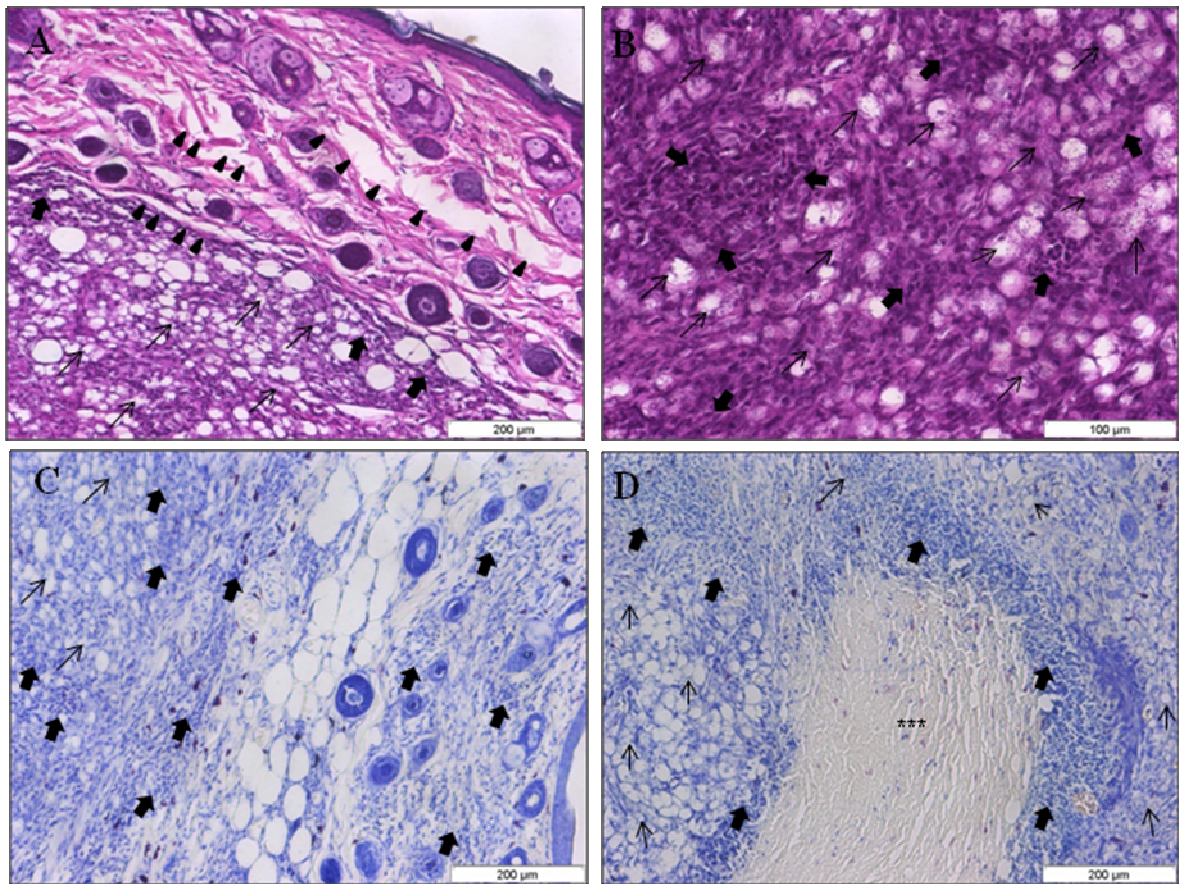


Figura 4.43 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com (-)- α -bisabolol 250mg/Kg/dia, no 30º dia de tratamento – Grupo B250. A e B: Coloração pela técnica de HE, A: Notou-se a presença de intenso infiltrado inflamatório (setas largas), constituído, principalmente, por neutrófilos e eosinófilos e parasitos (setas) na derme, com presença de fibras descontínuadas e desagregação da matriz extracelular (ponta de seta); B: lesão mais profunda mostrando intenso infiltrado inflamatório (setas larga) com presença de intenso parasitismo (seta); C e D: coloração pela técnica de Giemsa, C: presença de parasitos na derme e infiltrado inflamatório na derme e epiderme, fibras pouco compactadas apresentando vacúolos; D: Grande área de fibrose (asteriscos) rodeada por piócitos (setas largas) e intenso parasitismo (setas) na parte mais profunda da lesão.

Grupo B250 – 30 dias após o tratamento.

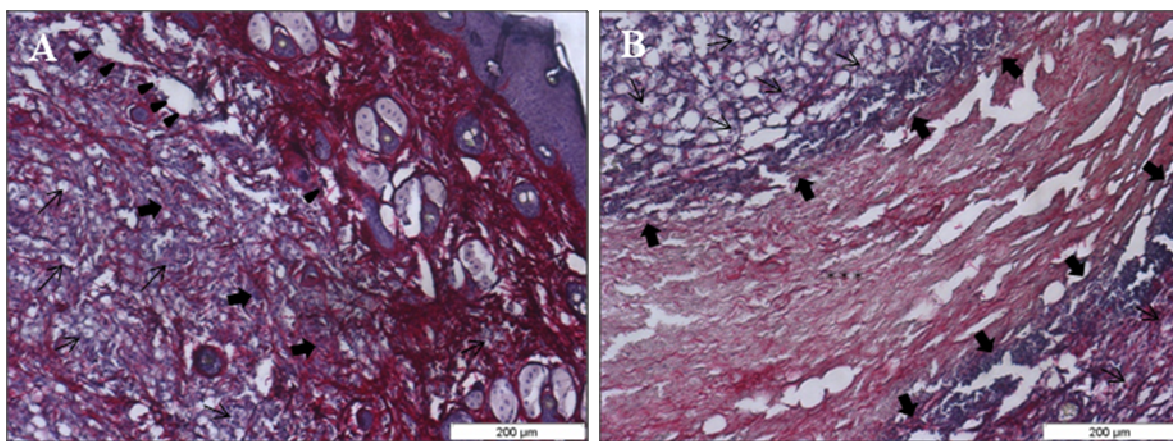


Figura 4.44 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com (-) α -bisabolol 250mg/Kg/dia, no 30° dia de tratamento – Grupo B250. A e B: Coloração pela técnica do Picrosirius red; A: Degradação da matriz extracelular (ponta de seta), infiltrado inflamatório (setas largas) e presença de inúmeros parasitos na derme (setas); B: Parte mais profunda da lesão permitindo a observação de grande área de fibrose (asteriscos) rodeada de intenso exsudato inflamatório (setas largas) com a presença de intenso parasitismo (setas).

Grupo Base – 30 dias após o tratamento.

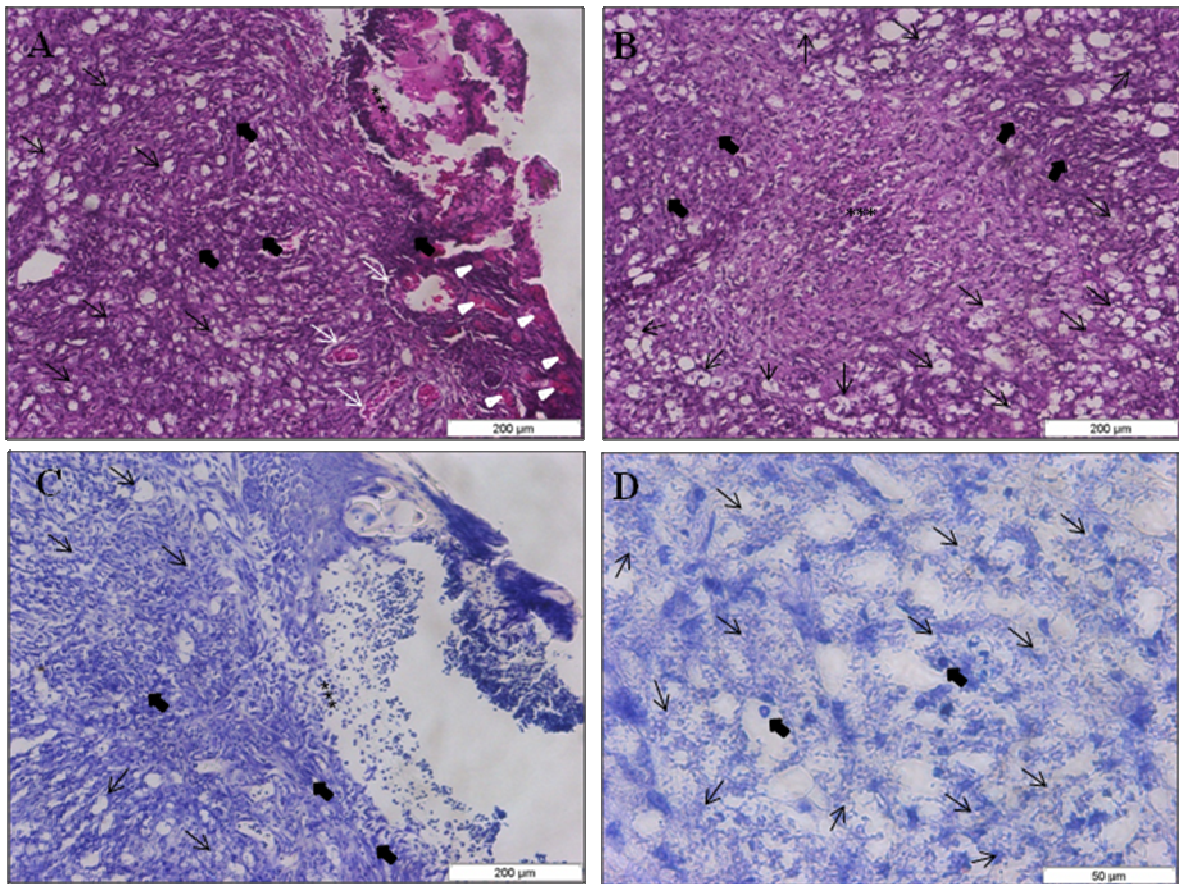


Figura 4.45 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com base, creme Lanette, no 30º dia de tratamento – Grupo Base. A e B: Coloração pela técnica de HE, A: Observou-se a presença de intenso infiltrado inflamatório (setas largas) e parasitos (setas) na derme e epiderme, além da presença de pequenos focos hemorrágicos, localizados próximos aos vasos sanguíneos (pontas de setas brancas), demonstrando ainda lesão ulcerada (asteriscos); B: Lesão mais profunda mostrando intenso infiltrado inflamatório (setas largas) com presença de intenso parasitismo (setas) em volta de grande área de exsudato inflamatório (asterisco); C e D: Coloração pela técnica de Giemsa de Lannert, C: Parasito na derme e infiltrado inflamatório na derme e epiderme, além de grande área ulcerada (asteriscos); D: Intenso parasitismo (setas) e as poucas células inflamatórias, com predomínio de neutrófilos (setas largas) na parte mais profunda da lesão.

Grupo Base – 30 dias após o tratamento.

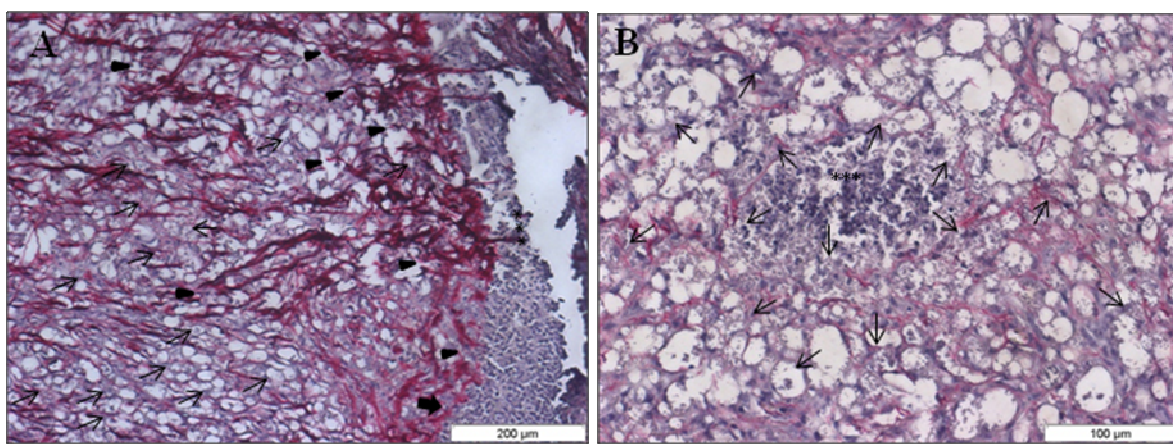


Figura 4.46 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com base, creme Lanette, no 30º dia de tratamento – Grupo Base. A e B: Coloração pela técnica do Picrosirius red; A: Foi possível observar muita degradação da matriz extracelular (ponta de seta), infiltrado inflamatório (setas largas), e a presença de inúmeros parasitos na derme (setas), além da presença da lesão ulcerada; B: Parte mais profunda da lesão mostrando área de necrose (asteriscos) rodeada de intenso parasitismo (setas).

Grupo Glu – 30 dias após o tratamento.

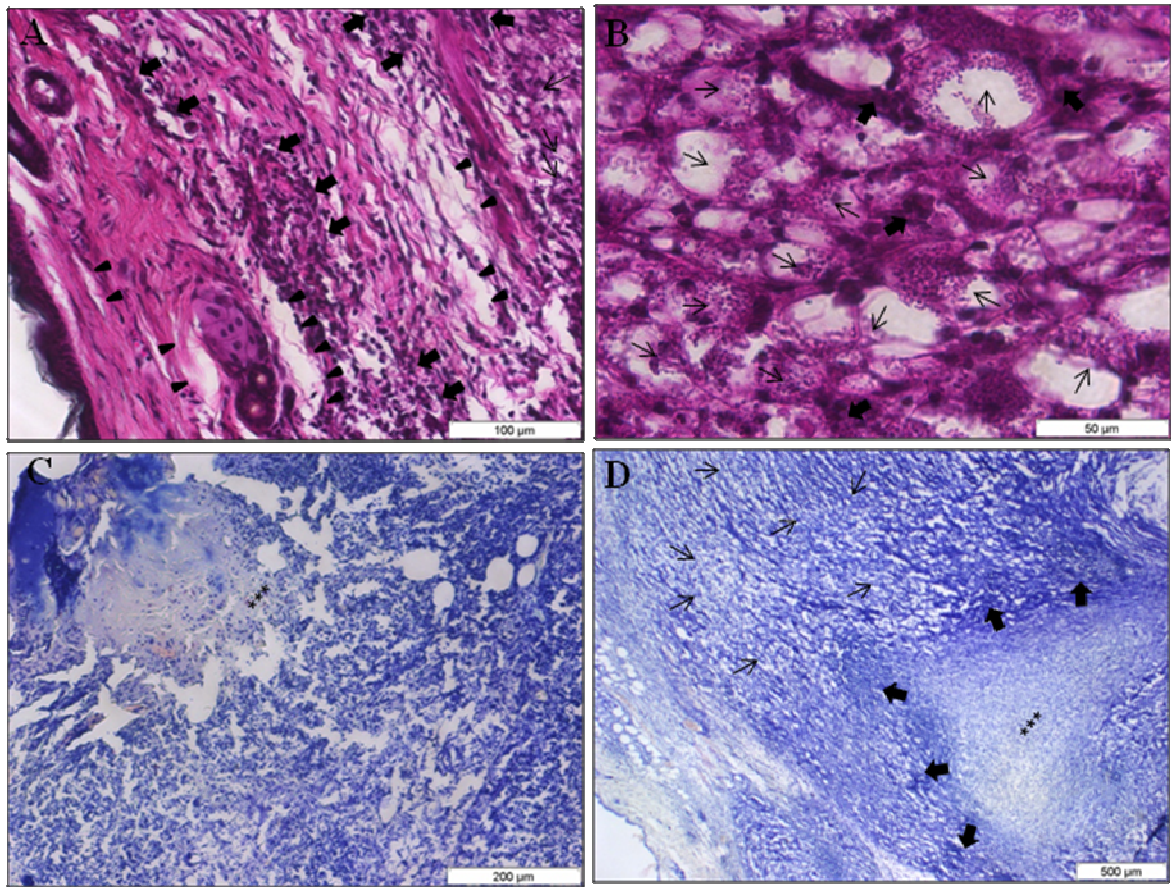


Figura 4.47 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com Glucantime[®], após 30 dias de tratamento – Grupo Glu. A e B: Coloração pela técnica de HE, A: Intenso infiltrado inflamatório (setas largas), com desagregação da matriz extracelular na derme superficial (pontas de setas), além da presença de parasitos (setas), B: Notou-se intenso parasitismo (setas), com muitos macrófagos vacuolizados com inúmeros parasitos, além de algumas células inflamatórias (setas largas); C e D: Coloração pela técnica de Giemsa de Lennert, C: Lesão ulcerada (asteriscos), com total destruição da arquitetura do tecido, sendo possível observar extensa área necrótica; D: Foi possível verificar, na parte mais profunda da lesão, grande área de exsudato inflamatório (asteriscos), com a presença de infiltrado inflamatório (setas largas) e de parasitos (setas) ao redor.

Grupo Glu – 30 dias após o tratamento.

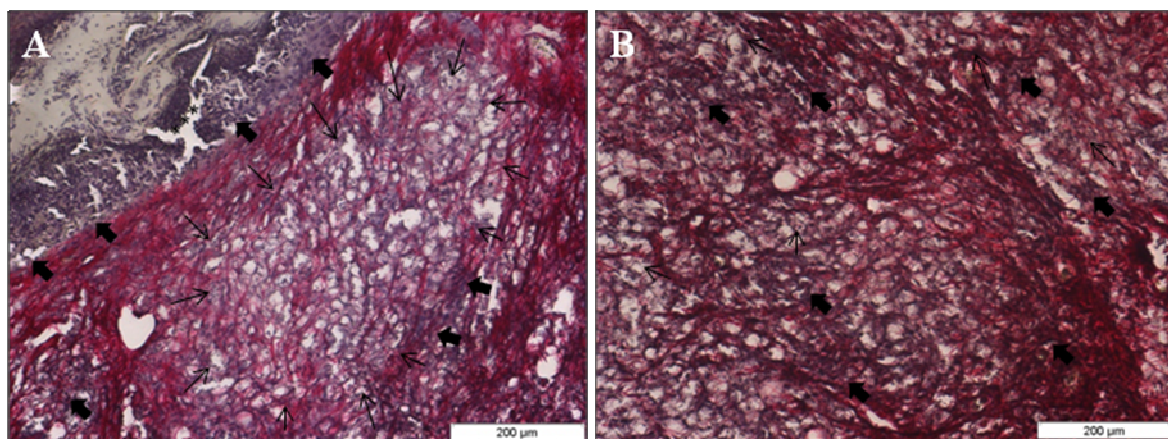


Figura 4.48 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis* e tratados com Glucantime[®], após 30 dias de tratamento – Grupo Glu. A e B: Coloração pela técnica do Picrosirius red; A: Área ulcerada (asterisco), com intenso infiltrado inflamatório (setas largas) e grande quantidade de fibras de colágeno em torno de grande área com intenso parasitismo (setas); B: Intenso parasitismo (setas) e infiltrado inflamatório (setas largas) entre fibras de colágeno.

Grupo CTRL/INF

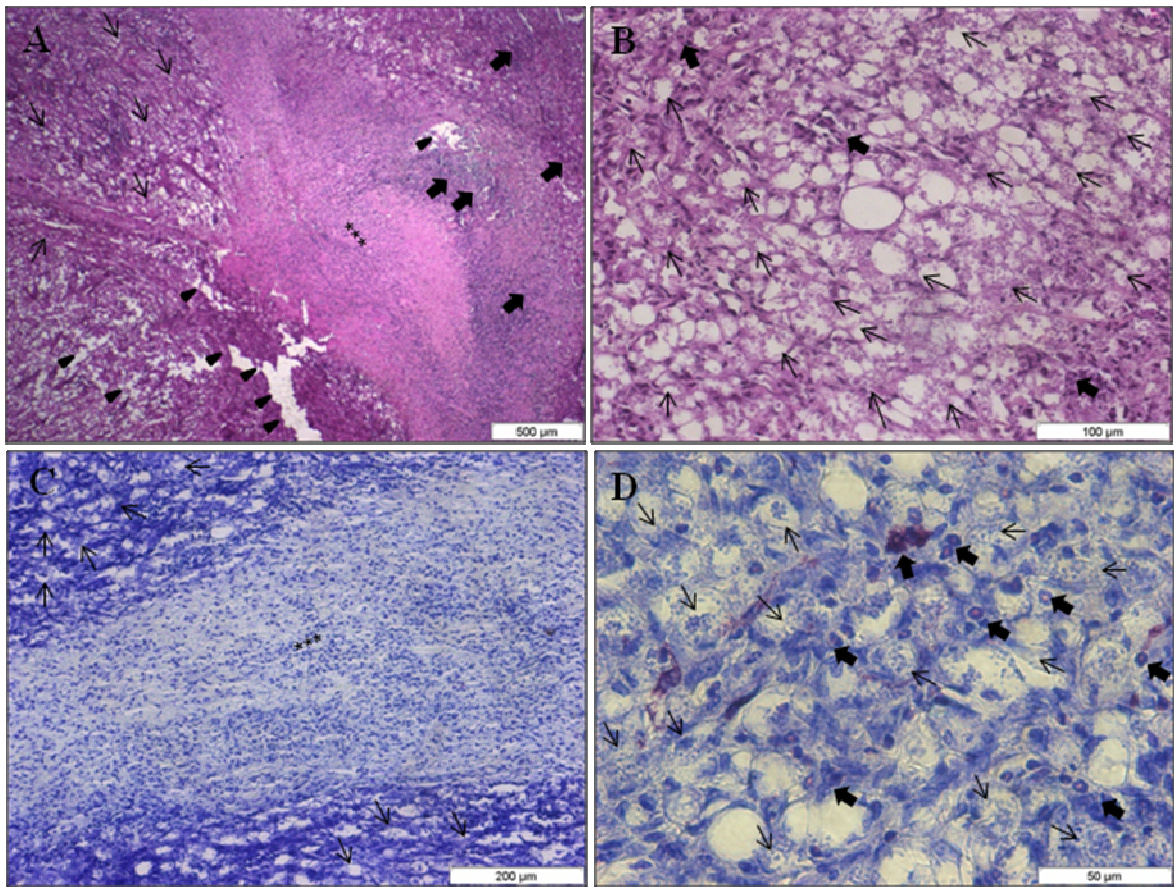


Figura 4.49 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis*, após 30 dias de tratamento – Grupo CTRL/INF. A e B: Coloração pela técnica de HE. A: Intenso parasitismo (setas) com grande infiltrado inflamatório (setas largas), presença de exsudato inflamatório (asteriscos), com inúmeros piócitos, além da desorganização na arquitetura do tecido (ponta de seta); B: Parte mais profunda da lesão demonstrou intenso parasitismo (setas), com a presença de células inflamatórias (setas largas); C e D: Coloração pela técnica de Giemsa de Lennert, C: Presença de intenso parasitismo (setas) e a presença de grande área de necrótica (asteriscos); D: Parte mais profunda da lesão mostra a presença de intenso parasitismo (setas) e várias células inflamatórias como, neutrófilos, eosinófilos e mastócitos (setas largas).

Grupo CTRL/INF

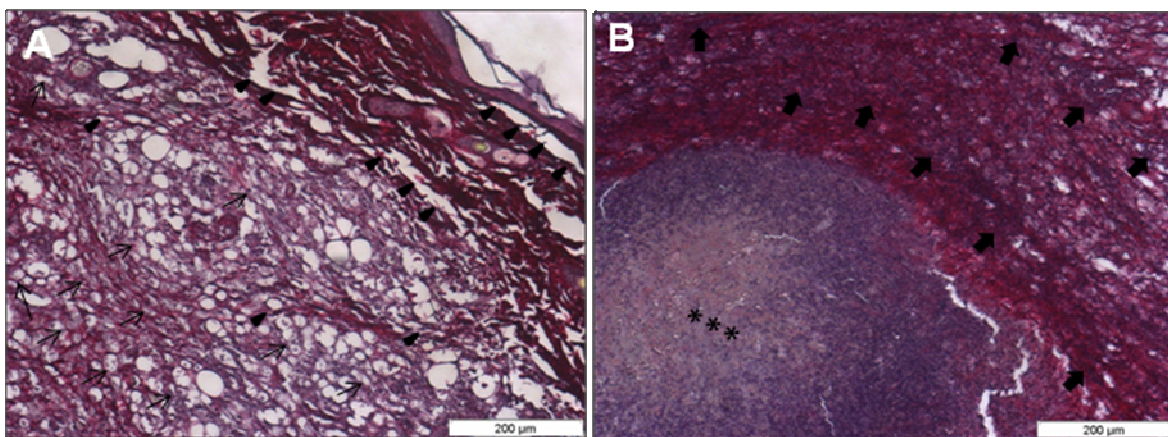


Figura 4.50 - Análise histopatológica da cauda de camundongos BALB/c, infectados com 10^4 formas amastigotas de *L. amazonensis*, no sexto e último ponto de necropsia – Grupo CTRL/INF. A e B: Coloração pela técnica do Picrosirius red; A: Intenso parasitismo (setas) e destruição com desagregação da matriz extracelular (pontas de setas); B: Intenso infiltrado inflamatório (setas largas) entre fibras de colágeno e, grande área necrótica no interior da lesão (asteriscos).

Grupo NI/B1.000 – 30 dias após o tratamento.

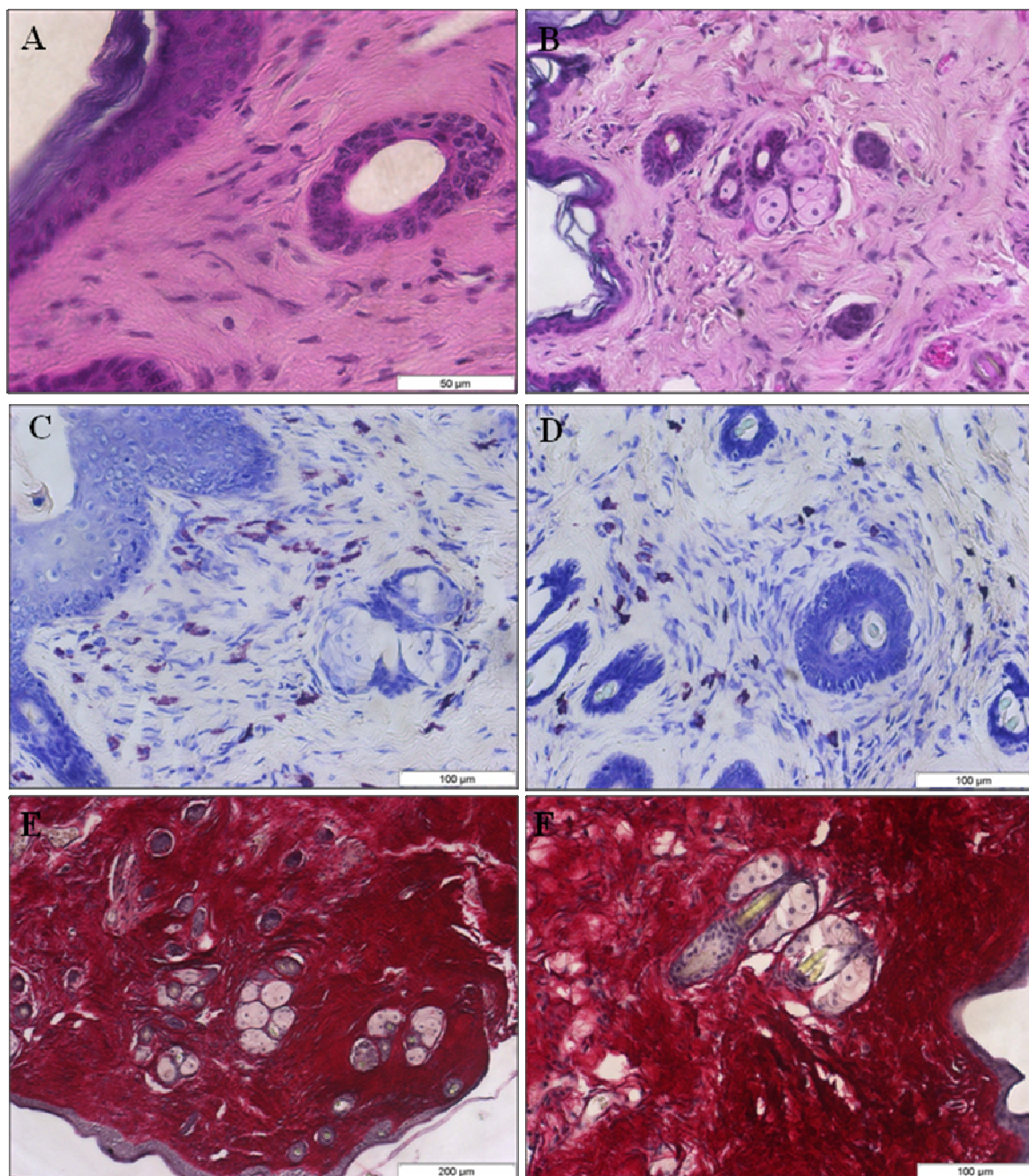


Figura 4.51 - Análise histopatológica de fragmentos da pele da cauda de camundongos BALB/c, não infectados, mas tratados com (-) α -bisabolol 1.000mg/Kg/dia, após 30 dias de tratamento – Grupo NI/B1.000. A e B: Coloração pela técnica de HE, tecido com características normais sem alterações; C e D: Coloração pela técnica de Giemsa, mostrando o tecido sem alterações; E e F: Coloração pela técnica do Picrosirius red, para a marcação das fibras de colágeno, demonstrando fibras espessas de aspecto normal.

Grupo NI/NT

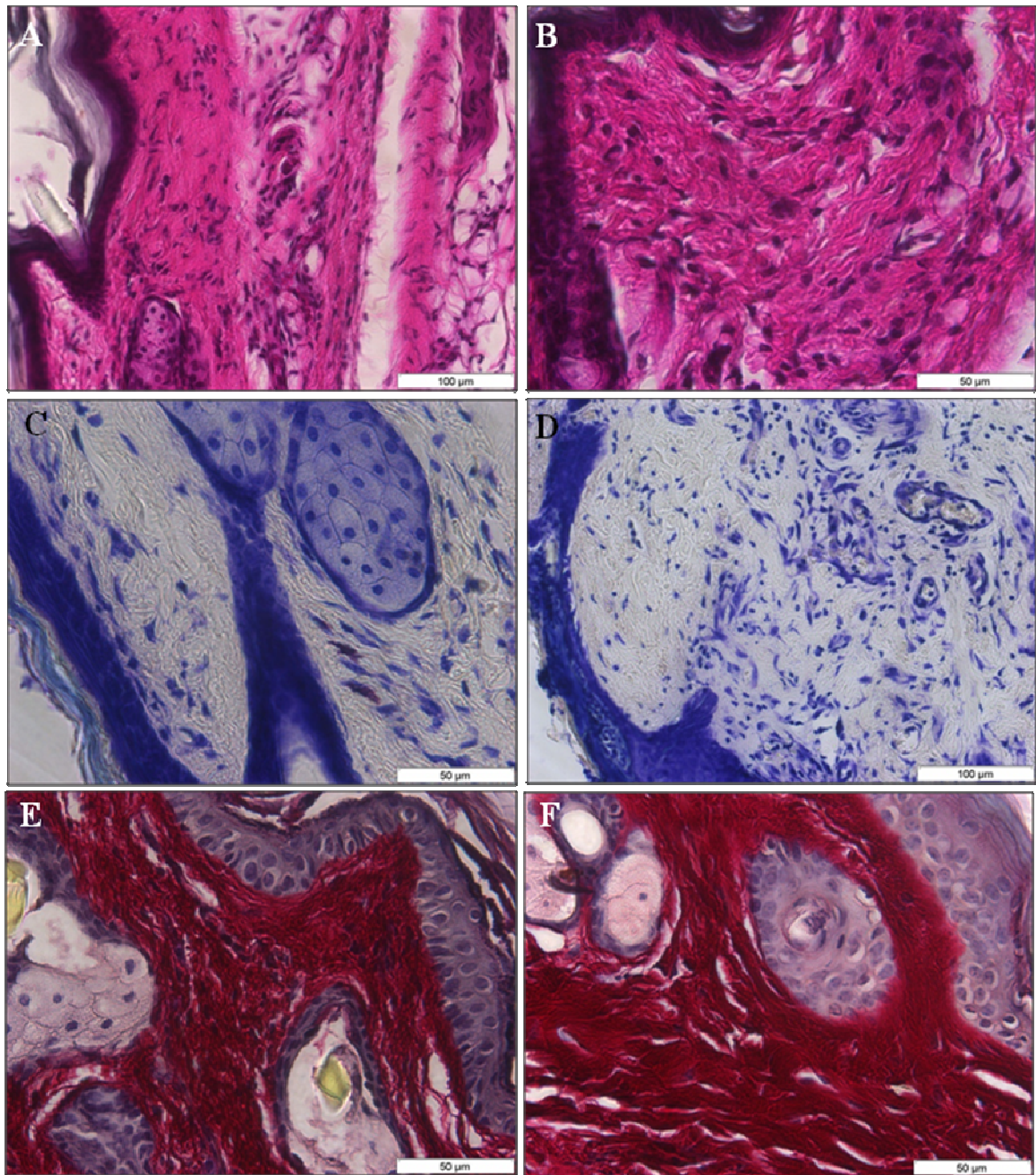


Figura 4.52 - Análise histopatológica de fragmentos da pele da cauda de camundongos BALB/c, não infectados e não tratados, no sexto e último ponto de necropsia – Grupo NI/NT. A e B: Coloração pela técnica de HE, tecido com características normais sem alterações; C e D: Coloração pela técnica de Giemsa, mostrando tecido sem alterações; E e F: Coloração pela técnica do Picrosirius red, para a marcação das fibras de colágeno demonstrando fibras espessas de aspecto normal.

4.8. Quantificação da carga parasitária

A quantificação *in situ* dos parasitos foi realizada através da técnica de PCR em tempo real em fragmentos das caudas dos camundongos infectados e tratados e dos camundongos infectados e não tratados. A quantificação da carga parasitária na fase aguda do tratamento, seis e 24 horas, mostrou resultados não significativos quando comparamos os grupos tratados com o grupo controle não tratado (Fig. 4.53). A quantificação foi realizada também na fase crônica de tratamento, e após sete dias de tratamento foi possível observar uma diferença significativa no grupo B500 e no grupo B250, quando comparados ao grupo CTRL/INF, (* $p \leq 0.05$). Os outros grupos avaliados não demonstraram diferença significativa quando comparados ao grupo CTRL/INF (Fig. 4.54).

Ao avaliar a quantificação parasitária dos animais, após 14 dias de tratamento, não observamos diferença significativa em nenhum dos grupos avaliados. Os mesmos resultados foram obtidos quando analisamos a carga parasitária após 30 dias de tratamento, não sendo possível observar diferença significativa entre os grupos testados, apesar de ser possível observar uma menor quantidade de parasitos no grupo B1.000 quando comparado a todos os outros grupos avaliados (Fig. 4.54).

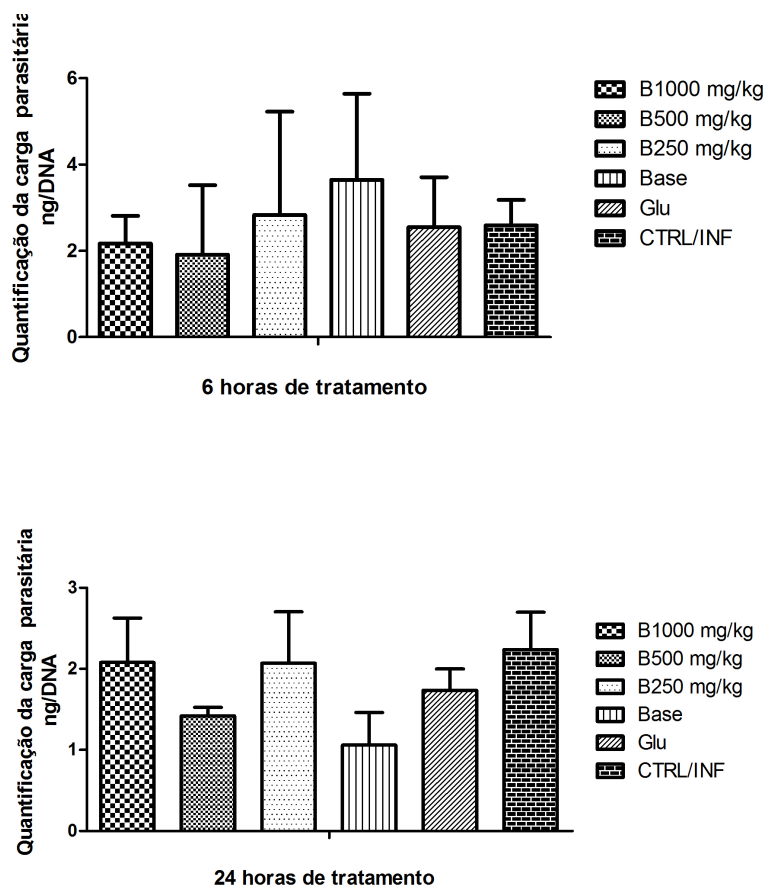


Figura 4.53 – Quantificação da carga parasitária através do PCR em tempo real. A cauda dos animais infectados e tratados ou somente infectados, foi utilizada para a quantificação de parasitos. A primeira e a segunda quantificação da carga parasitária foram realizadas na fase aguda do tratamento, seis e vinte e quatro horas, após o início deste. Os dados foram analisados no GraphPad Prism 5.0, e as diferenças entre os grupos foram avaliadas através do teste One-way ANOVA.

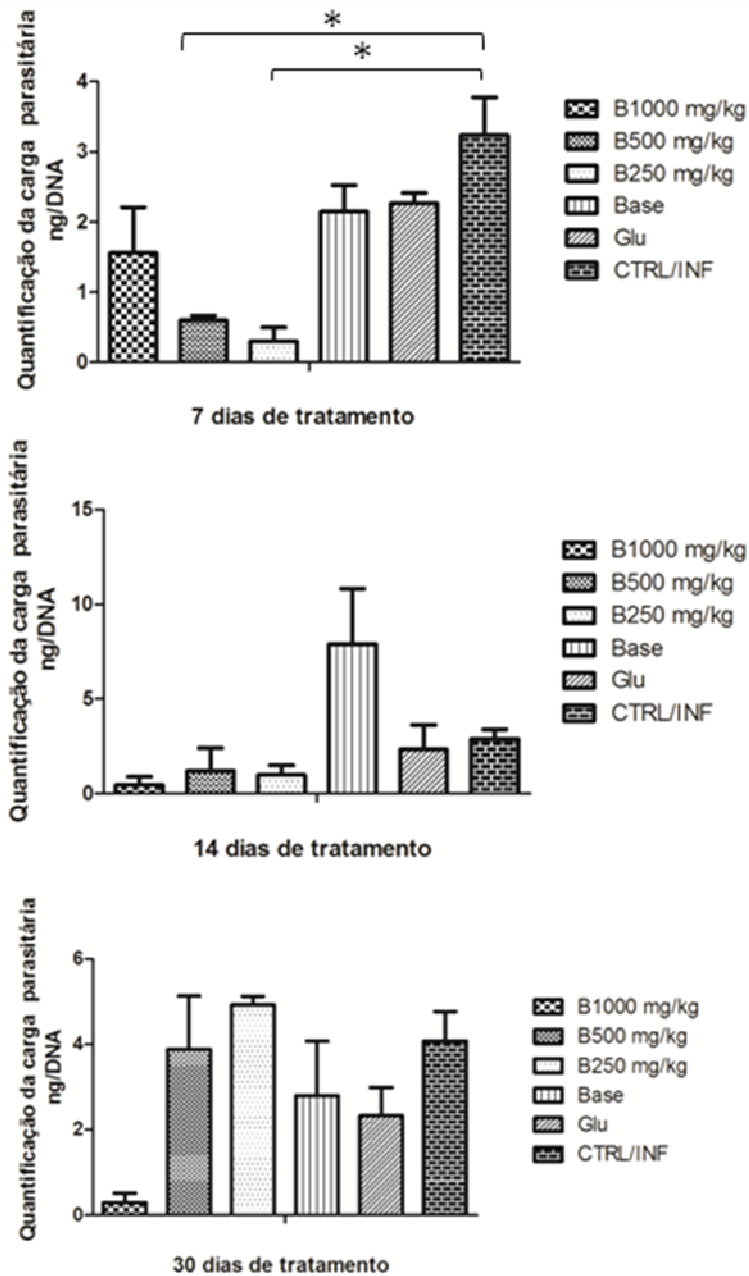


Figura 4.54 – Quantificação da carga parasitária através do PCR em tempo real. A cauda dos animais, que foram infectados e tratados ou somente infectados, foi utilizada para a quantificação de parasitos. A quantificação da carga parasitária foi realizada na fase crônica do tratamento, 7, 14 e 30 dias, após o início do tratamento. Os dados foram analisados no GraphPad Prism 5.0, e as diferenças entre grupos foram avaliadas através do teste One-way ANOVA.

5. DISCUSSÃO

As leishmanioses são consideradas doenças emergentes e reemergentes, com um preocupante aumento da sua incidência, principalmente nas duas últimas décadas (Goto & Lindoso, 2010). Os compostos orgânicos de antimônio são desde sua introdução no tratamento da leishmaniose por Vianna em 1912, as drogas de primeira escolha. Os antimoniais pentavalentes foram manufaturados e introduzidos na terapêutica entre 1935-1945, sendo o primeiro deles o stibogluconato de sódio, Pentostan[®] e, logo após, o N-metil glucamina, Glucantime[®] (Brenzan et al., 2007).

Os fármacos de segunda escolha como a anfotericina B, a mitelfosina, a paromomicina e a pentamidina também são utilizados no tratamento das leishmanioses, principalmente quando o paciente possui alguma contraindicação ao uso de antimônios (Chávez-Fumagalli et al., 2015, Kaur & Rajput, 2014, Singh et al., 2012, Croft, et al., 2006). Entretanto, todos estes fármacos possuem desvantagens e várias contraindicações (Morais-Teixeira et al., 2013, Gazanion et al., 2011, Frézard et al., 2009). A principal desvantagem relacionada a estes compostos é a necessidade de serem administrados por via parenteral, diariamente, por no mínimo três semanas, além da necessidade de supervisão médica para a administração do tratamento. Outra desvantagem é que não são fármacos recomendados para tratar mulheres grávidas, cardiopatas e nefropatas. A sua utilização, de forma não controlada, também pode causar diminuição da suscetibilidade do parasito ao fármaco de primeira escolha. Já os efeitos colaterais causados por estes fármacos são, náuseas, vômitos, mialgia, diarreia, cefaléia, rash cutâneo, hepatotóxicidade e cardiotoxicidade (Gazanion et al., 2011, Blum & Hatz, 2009, Frézard et al., 2009).

Assim, devido às dificuldades, contraindicações e com o intuito de desenvolver um tratamento com menos efeitos colaterais, muitos grupos de pesquisa estão estudando produtos naturais, com atividades contra protozoários. Assim, nos últimos anos, diversos extratos, óleos essenciais e componentes isolados de plantas começaram a ser utilizados em ensaios experimentais.

Diversos grupos de pesquisas já utilizam estes compostos em ensaios experimentais, contra diversos patógenos, incluindo a *Leishmania*. Dentre eles está o estudo experimental publicado por Guimarães et al. (2010), no qual foi utilizado um alcalóide, isolado da *Croton pullei var. glabrior*, que é uma planta amplamente encontrada na floresta Amazônica. Este alcalóide foi testado contra formas promastigotas e amastigotas de *Leishmania amazonensis* e demonstrou uma potente atividade leishmanicida *in vitro*. Além do estudo de Morales-Yuste et al.(2010), o qual

demonstrou que o α -bisabolol, que é o componente majoritário isolado do óleo essencial da *Matricaria chamomilla*, foi capaz de inibir o crescimento de *Leishmania infantum*, *in vitro*, utilizando pequenas concentrações deste composto. Em outro trabalho, publicado por Medeiros et al. (2011), foi evidenciada a ação leishmanicida, também *in vitro*, do óleo essencial da *Lippia sidoides cham*, que é um arbusto silvestre originário do nordeste do Brasil, e também do seu composto majoritário isolado.

Seguindo a mesma linha de pesquisa, nosso grupo obteve resultados que comprovaram a atividade leishmanicida do (-) α -bisabolol contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *Leishmania amazonensis*. Os resultados mostraram que o (-) α -bisabolol foi capaz de inibir 50% do crescimento (IC₅₀) de formas promastigotas com uma concentração de 8.07 μ g/ml. Quando testado contra formas amastigotas intracelulares, a concentração capaz de inibir o crescimento em 50% foi de 4.29 μ g/ml (Rottini et al. 2015). Estes resultados sugerem que formas amastigotas são mais suscetíveis ao tratamento com (-) α -bisabolol do que formas promastigotas corroboram com os resultados obtidos por Ueda-Nakamura et al. (2006) em seus estudos com *L. amazonensis* e óleo essencial de *Ocimum gratissimum*.

Com o intuito de investigar as alterações ultraestruturais que o (-) α -bisabolol poderia causar na *Leishmania*, realizamos análises por microscopia eletrônica de transmissão de formas promastigotas tratadas com (-) α -bisabolol, em diferentes tempos. Foi possível observar diversas alterações causadas pelo (-) α -bisabolol nas formas promastigotas, de forma crescente, dependente do tempo de tratamento. Dentre as principais alterações destacamos o aumento do volume da mitocôndria, presença de estruturas eletrondensas e desorganização celular com aumento de inclusões lipídicas no citoplasma. Além disso, notou-se a presença de vesículas na bolsa flagelar, descontinuidade da membrana nuclear, dano no cinetoplasto, condensação da cromatina, membrana plasmática com descolamento da bicamada lipídica, perda da organização dos microtúbulos e perda das organelas citoplasmáticas com presença de projeções na mesma.

Brenzan et al. (2007) mostraram que as alterações morfológicas estruturais causadas por drogas que inibem a síntese de ergosterol são muito semelhantes às alterações causadas por diferentes compostos derivados de plantas com atividade leishmanicida. Dentre as alterações causadas por inibidores da síntese de ergosterol destacamos o aumento de volume mitocondrial, aumento no número de inclusões lipídicas no citoplasma e a intensa atividade de exocitose na região da bolsa flagelar.

Estas alterações também foram observadas por outros grupos de pesquisa que estudam a atividade de compostos derivados de plantas com atividade leishmanicida. Dentre esses grupos, destacam-se o de Ueda-Nakamura et al. (2006) que relatou a atividade leishmanicida do Eugenol, o principal constituinte do óleo essencial de *Ocimum gratissimum* e o de Guimarães et al. (2010) que evidenciou a atividade de julocrotine, um alcalóide isolado de *Croton pullei var*, contra parasitos do gênero *Leishmania*. Além desses, outros autores mostraram alterações estruturais muito semelhantes às causadas pelos inibidores da síntese de ergosterol nas formas promastigotas e nas formas amastigotas intracelulares de *L. amazonensis*, quando tratadas com os óleos essenciais de *Lippia sidoides cham.* e *Cymbopogon citratus* (Medeiros et al. 2011, Santin et al. 2009). De forma semelhante a estes autores, no presente estudo também observamos alterações estruturais causadas pelo (-)- α -bisabolol nas formas promastigotas de *L. amazonensis*, de forma crescente e dependente do tempo de tratamento, tais como: o aumento do volume da mitocôndria, presença de estruturas eletrondensas e desorganização celular com aumento de inclusões lipídicas no citoplasma. Uma das hipóteses que explicaria estas alterações é a capacidade que compostos presentes nos óleos essenciais têm de penetrar nas células e comprometer a biossíntese de ergosterol (Medeiros et al. 2011).

Além disso, dentre as alterações encontradas no nosso estudo, a que mais se destacou foi o comprometimento mitocondrial. De acordo com estudos recentes, as alterações na permeabilidade da membrana, particularmente mitocondrial, podem levar à morte programada do parasito. O comprometimento do potencial da membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) pode ser observado usando TMRE. Este corante é retido pelas células viáveis, evidenciando a existência de alterações na permeabilidade da membrana mitocondrial (Salomão et al., 2013, Mutai Waitumbi, 2010). Utilizando este corante, conseguimos demonstrar que o (-)- α -bisabolol é capaz de atravessar a membrana mitocondrial, conduzindo à morte desses parasitos. Através da citometria de fluxo demonstramos uma mudança significativa no potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) de 69,06% dos parasitos, quando tratados com 8.07 $\mu\text{g/ml}$ de (-)- α -bisabolol.

Este resultado confirma os efeitos tóxicos de compostos altamente lipofílicos derivados de plantas, tal como demonstrou Medeiros et al. (2011). A capacidade de atravessar a membrana das formas promastigotas e amastigotas é encontrada em componentes altamente lipofílicos, tais como compostos derivados de plantas, o que leva à perda de impermeabilidade a certos compostos como os eletrólitos intrínsecos,

causando a morte celular (Medeiros et al. 2011). Esta característica pode contribuir para a atividade tóxica destes compostos contra vários microorganismos, tais como a *Leishmania*, e esta pode ser outra hipótese para explicar a morte dos parasitos, tratados com compostos naturais.

Além disso, também demonstramos, através da análise por MET, que o (-) α -bisabolol pode passar através da membrana celular e causar danos às formas amastigotas intracelulares, sem causar qualquer alteração nas células J774.G8. Nas concentrações utilizadas neste experimento foi possível notar que o (-) α -bisabolol possui maior citotoxicidade sobre o parasito do que sobre a célula hospedeira. Os mesmos resultados de citotoxicidade foram observados por Mahmoudvand et al. (2015) em estudos de atividade antileishmanicida e efeitos citotóxicos, *in vitro*, do óleo essencial e do extrato metanólico do *Myrtus communis* em *L. tropica*.

O α -bisabolol interage com as membranas biológicas, e estas interações levam a mudanças na estrutura e funcionalidade das mesmas que, por sua vez, podem prejudicar o crescimento e a fisiologia das células. O acúmulo do α -bisabolol na membrana lipídica e a consequente mudança na sua estrutura como, a expansão, a mudança na fluidez e/ou o rompimento da interação proteína-lipídio, pode estar relacionada com a sua ação tóxica na membrana, como descrito por Sikkema et al. (1994) no estudo dos terpenos. Contudo, nossos resultados mostram que o (-) α -bisabolol apresentou uma maior citotoxicidade aos parasitos do que as células hospedeiras. Outro fato importante relacionado com a atividade citotóxica dos óleos essenciais e/ou de seus compostos é, em grande parte, devido à presença de funções orgânicas como: fenóis, aldeídos e álcoois nos compostos presentes nos óleos (Bakkali et al. 2008). Essa atividade pode ser outra provável causa para explicar a ação leishmanicida do (-) α -bisabolol, devido à presença de uma hidroxila na parte exocíclica da molécula.

Baseado nos resultados *in vitro* obtidos pelo nosso grupo utilizando o (-) α -bisabolol e nos frequentes trabalhos publicados usando compostos naturais no tratamento experimental contra leishmaniose *in vivo* como Corpas-López et al. (2015), Kalpana & Sachdeva (2014), Tiunan e colaboradores (2012), Arruda et al (2009) entre outros, desenvolvemos três formulações tópicas contendo (-) α -bisabolol, utilizadas no presente estudo, as quais se mantiveram estáveis quando confrontadas com os testes de estabilidade.

Durante o tratamento com as formulações contendo (-) α -bisabolol não observamos alterações citotóxicas que pudessem estar relacionadas com o tratamento.

Esses resultados puderam ser confirmados através da análise dos animais do grupo NI/B1.000, não infectados, mas tratados com 1.000 mg/kg/dia de (-)- α -bisabolol, durante todo o experimento.

Aos analisarmos os animais na fase aguda de tratamento, não observamos diferenças significativas em nenhum dos parâmetros avaliados. Os grupos infectados e tratados, quando comparados ao grupo somente infectado, não mostraram diferenças no peso, no tamanho da lesão, e também não observamos diferença significativas nas análises bioquímicas e hematológicas. Além disso, também não houve diferença na avaliação histopatológica, assim como não observamos diferença entre os grupos na quantificação da carga parasitária.

Entretanto, ao analisarmos os animais após 7 dias de tratamento, notamos algumas diferenças entre os grupos. A primeira diferença foi percebida na medida da lesão. Foi observado que o grupo B1.000, apresentou uma diferença significativa quando comparado a todos os outros grupos analisados. Ao analisarmos o grupo B500 observamos que este grupo, só apresentou uma diferença significativa no final do tratamento quando comparado aos grupos Base, Glu e CTRL/INF. Contudo, ao confrontarmos os resultados do grupo B250 com os grupos Base, Glu e CTRL/INF, vimos que não houve diferença significativa de tamanho da lesão do grupo B250, tratado com 250mg/Kg/dia de (-)- α -bisabolol, com relação com aos outros grupos. Com estes resultados foi possível demonstrar que o (-)- α -bisabolol é capaz de causar uma regressão das lesões, sendo esta, dose dependente.

Outros estudos utilizando tratamento tópico, com nanosilver, mostraram também que o tratamento utilizado para diminuição da carga parasitária pode levar a diminuição de infecção secundária, o que favorece a diminuição do tamanho da lesão como descrito por Nilforoushzadeh et al. (2012).

No nosso estudo, a avaliação histopatológica no 7º dia de tratamento mostrou ainda muito infiltrado inflamatório e grande quantidade de parasitos, mesmo nos grupo tratados com (-)- α -bisabolol. Contudo, foi possível perceber uma diminuição da carga parasitária do grupo B1.000 quando comparado com o grupo CTRL/INF. Ao examinarmos os animais do grupo B500 observamos uma diminuição significativa da carga parasitária quando comparado com o grupo controle. O resultado da análise do grupo B250 demonstrou uma lesão com ainda mais danos com relação à desorganização da arquitetura do tecido, entretanto, observamos que o grupo B250 apresentou a menor quantidade de parasitos nas lesões, mostrando resultado significativo quando

comparado com o grupo CTRL/INF. Os camundongos dos grupos Base, Glu e CTRL/INF demonstraram lesões mais graves que os animais tratados com (-)- α -bisabolol, nas diferentes concentrações, mostrando as maiores concentrações de parasitos nas lesões. Esses resultados são semelhantes aos observados por Kaur et al. (2014), em estudos com camundongos da linhagem BALB/c infectados por *Leishmania* e tratados com fitoterápicos derivados da *Withania somnifera* e do *Aparagus racemosus*. No estudo deste grupo de pesquisa foi mostrado que animais somente infectados mostraram uma carga parasitária maior do que os animais tratados após 7 dias de tratamento oral com os fitoterápicos, mostrando que compostos naturais podem apresentar atividade leishmanicida, logo após o início do tratamento, com redução significativa da carga parasitária.

Ao analisarmos os animais, após 14 dias de tratamento, as diferenças entre os grupos se tornaram ainda mais evidentes. Além da redução no tamanho das lesões terem se tornado mais perceptíveis nos grupos B1.000 e B500, quando comparados com os outros grupos, a análise histopatológica demonstrou diversas modificações. Notamos ainda o desaparecimento total da infecção secundária na parte superficial das lesões nos grupos que foram tratados com o (-)- α -bisabolol.

A histopatologia dos animais do grupo B1.000 mostrou que a maioria dos animais analisados apresentavam a epiderme e a parte superior da derme sem alterações, sugerindo uma tentativa de reparação e/ou cicatrização. Entretanto, na derme mais profunda ainda era possível observar diversos focos de parasitos e infiltrado inflamatório contendo, basicamente, neutrófilos e eosinófilos. Verificamos também a presença de largas fibras de colágeno, demonstrando, novamente, uma possível tentativa de reparação da lesão. Foi possível observar ainda a presença de pequenas áreas de fibrose. A análise do grupo B500 mostrou que havia mais infiltrado inflamatório contendo, principalmente, neutrófilos e mais macrófagos vacuolizados com inúmeros parasitos, além da formação de fibrose em volta de área necrótica. A análise dos animais do grupo B250 demonstrou a presença de danos ainda maiores do que os dos animais do grupo B500, não sendo possível observar uma diferença significativa entre este grupo e os grupos que receberam Base, Glu e os CTRL/INF. Além disso, a análise da parte mais profunda da lesão evidenciou a presença de muitos parasitos em torno de uma grande área necrótica, com fibras de colágeno destruídas devido ao processo necrótico e à presença de inúmeros parasitos.

Os grupos Base, Glu e CTRL/INF mostraram lesões semelhantes, demonstrando um aumento progressivo das lesões e maiores prejuízos neste ponto de análise. Além disso, houve o aumento da infecção secundária superficial em todos esses grupos, provavelmente, causada por bactérias na parte ulcerada das lesões. Contudo, não observamos diferenças significativas nas análises bioquímicas e hematológicas e nem na quantificação da carga parasitária, nestes grupos analisados.

Assim, uma das hipóteses que pode explicar os melhores resultados do tratamento com 1.000 mg/Kg/dia de (-) α -bisabolol, o qual demonstrou menor dano tecidual nos animais como descritos acima, seria a diminuição do processo inflamatório que foi gerado em excesso pela infecção por *Leishmania*, essa hipótese foi confirmada por Maurya et al. (2014) ao mostrar em estudos *in vivo* que o (-) α -bisabolol é capaz de reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias como o TNF- α e a IL-6. Neste estudo Maurya et al. 2014 demonstraram que os camundongos desafiados com lipopolissacarídeos (LPS) e 12-O-tetradecanoyl-phorbol-13-acetate (TPA) sofreram uma indução do processo inflamatório na orelha, que foi reduzido no grupo tratado com (-) α -bisabolol através do tratamento tópico. Os resultados evidenciados, neste trabalho, mostraram que o (-) α -bisabolol diminuiu algumas citocinas pró-inflamatórias, reduzindo desta forma o dano causado ao tecido.

Além disso, como mostrado por Romagnoli et al. (2015) e sugerido por Pauli (2006) o α -bisabolol possui excelente atividade fungicida, através da inibição da síntese de ergosterol, quando testado contra diferentes fungos. Essa seria a outra hipótese que explicaria os melhores resultados da maior concentração de (-) α -bisabolol em nosso tratamento tópico, já que teria uma maior concentração, deste composto, disponível para atuar contra a *Leishmania*, que contém ergosterol na sua membrana. Esta inibição leva a alteração da permeabilidade celular destes parasitos, levando-os à morte (Chávez-Fumagalli et al., 2015, Kaur & Rajput, 2014).

Ao final do experimento concluímos que durante os 30 dias de tratamento os camundongos do grupo B1.000 apresentaram uma regressão no tamanho das lesões, com o fechamento e/ou cicatrização das mesmas, além da diminuição da carga parasitária. Resultados semelhantes foram observados por Arruda et al. (2009) utilizando tratamento tópico e intrarectal com Limoneno.

Ao compararmos o grupo B1.000 com todos os outros grupos, observamos que os animais deste grupo mostraram regressões nas lesões, apresentando menor dano tecidual e menos parasitos do que todos os outros grupos. Entretanto, a maior diferença

observada foi quantitativa, uma vez que ainda foi possível evidenciar parasitos, infiltrados inflamatórios e pequenos focos de fibrose nestas lesões.

Uma explicação para que o tratamento não tenha diminuído ainda mais o parasitismo, e conseqüentemente o infiltrado inflamatório, pode ser devido ao fechamento das lesões ocasionado pelo tratamento com o (-)- α -bisabolol, que proporcionou uma cicatrização superficial. Em trabalho publicado por Gonçalves et al. (2005), foi visto que a penetração do tratamento tópico pode influenciar no curso da lesão. Além disso, foi relatado por Castro et al. (2003) que a penetração de compostos através da pele íntrega é menor do que quando comparada a uma pele descamada. Essa pode ser a explicação para que o tratamento com 1.000 mg/Kg/dia de (-)- α -bisabolol não tenha ainda apresentado melhores resultados, já que com a cicatrização da lesão houve a diminuição da permeabilidade da formulação tópica e, conseqüentemente, não houve a resolução da lesão.

A análise do grupo B500 ao final do experimento mostrou grande diferença quando comparado com o grupo B1.000. Este grupo apresentou uma grande área de necrose, o que pode ter dificultado ainda mais a penetração da formulação tópica e, conseqüentemente, gerado o aumento do tamanho das lesões. Ao analisarmos a quantificação parasitária do grupo B500 vimos, novamente, grande diferença entre esse grupo e o grupo B1.000, já que a quantificação parasitária no grupo B500 foi muito parecida com o grupo CTRL/INF, grupo somente infectado.

Os camundongos do grupo B250 apresentaram, no final do experimento, intenso infiltrado inflamatório e alto parasitismo nas lesões, além de uma grande área de fibrose rodeada de exsudato inflamatório. Nesse caso, também se confirma a hipótese, descrita acima para o grupo B500. Quanto à quantificação parasitária deste grupo, vimos que neste ponto o grupo B250 foi o que apresentou maior parasitismo, provavelmente, devido à dificuldade ainda maior de penetração da formulação tópica e à menor concentração de (-)- α -bisabolol.

Já os animais do grupo que receberam Base, Glu e os CTRL/INF mostraram uma piora progressiva das lesões com aumento de tamanho das mesmas e presença de exsudato inflamatório. Entretanto, apesar dos danos causados no grupo Glu terem sido parecidos com os grupos Base e CTRL/INF, houve uma maior tentativa de reparação no grupo Glu que nestes outros grupos. A análise histopatológica desses grupos foi muito semelhante demonstrando a presença de intenso parasitismo, desorganização da arquitetura do tecido, provavelmente devido à intensidade de parasitos e exsudato

inflamatório presentes nos tecidos analisados. Além de observar grande área necrótica no interior da lesão, principalmente, no grupo CTRL/INF.

Por fim, ao analisarmos o grupo 7 com animais não infectados, mas tratados com 1.000mg de (-) α -bisabolol, observamos o tecido com características normais sem alterações na derme e epiderme após os 30 dias de tratamento, não sendo possível notar nenhuma alteração citotóxica que pudesse ser causada pelo (-) α -bisabolol.

Baseados nos resultados obtidos foi possível concluir que, devido à ação cicatrizante e bactericida do (-) α -bisabolol, as lesões dos grupos que foram tratados com as formulações tópicas fecharam. Entretanto, como ainda havia parasitos e, provavelmente, a presença de bactérias na parte mais profunda das lesões, houve a multiplicação destes patógenos e aumento do tamanho das lesões, devido a menor concentração do (-) α -bisabolol nas formulações e também à diminuição da sua penetração, principalmente, nos grupos B500, tratado com 500 mg/Kg/dia de (-) α -bisabolol, e B250. tratado com 250 mg/Kg/dia de (-) α -bisabolol.

De forma geral, uma hipótese que poderia explicar a persistência dos parasitos nas lesões dos animais tratados seria a sugerida por Murray et al. (2000), os quais mostraram que, devido à falta de capacidade dos camundongos da linhagem BALB/c de produzir IFN-gama e, conseqüentemente, de apresentar uma resposta imune eficaz, os camundongos desta linhagem são incapazes de controlar a infecção por *Leishmania sp*, o que permite a mutiplicação dos parasitos na lesão que se torna recidiva. Nesse artigo foi demonstrado que o tratamento efetuado com o antimônio pentavalente em camundongos BALB/c não se mostrou eficaz, provavelmente, devido à resposta imune deficiente desta linhagem, que produz baixas concentrações desta citocina.

Além disso, como foi proposto por Morgado et al (2008), a eliminação das formas amastigotas depende, principalmente, de mecanismos oxidativos tais como os compostos reativos de oxigênio e óxido nítrico, que novamente poderiam explicar a presença de parasitos nas lesões, já que esta linhagem de camundongos não possui uma resposta imune muito eficaz.

Outro argumento que reforça essa hipótese foi publicado por Mears et al. (2015), os quais demonstraram que os animais da linhagem BALB/c quando infectados com algumas espécies de *Leishmania*, inclusive a *L. amazonensis*, desenvolvem uma grande úlcera na pele, que se expande causando metástase e podendo levar os animais à morte. Neste artigo foi demonstrado que, devido à resposta imune ineficaz da linhagem BALB/c, é um equívoco utilizá-lo para avaliar a eficácia de novos compostos com

atividade leishmanicida. Segundo Mears et al. (2015) a imunossupressão destes animais poderia resultar na incapacidade de detecção de compostos potencialmente úteis.

Assim, acreditamos que o tratamento tópico utilizando (-) α -bisabolol não apresentou melhores resultados devido a alta sensibilidade dos BALB/c frente a infecção pela *L. amazonensis*. Contudo, mesmo assim, no nosso estudo foi possível observar que os animais tratados com (-) α -bisabolol apresentaram uma resolução parcial das lesões, além da grande diminuição da carga parasitária nos animais do grupo B1.000.

Diante dos resultados obtidos podemos concluir e destacar que o (-) α -bisabolol possui ação leishmanicida tanto *in vitro* quanto *in vivo*. Neste sentido, é importante salientar que esse composto mostra um potencial promissor para ser utilizado como tratamento tópico da leishmaniose tegumentar, o que possibilita darmos continuidade às pesquisas para o aprimoramento da sua formulação e adequação de um modelo animal. Com estas modificações acreditamos que será possível avaliar melhor a capacidade leishmanicida do (-) α -bisabolol no tratamento tópico para a leishmaniose tegumentar.

6. Conclusões

Com base nos estudos realizados concluímos que;

1. Nos ensaios *in vitro* a concentração de 8.07µg/mL de (-)α-bisabolol demonstrou atividade leishmanicida contra as formas promastigotas, e amastigotas intracelulares;
2. O (-)α-bisabolol causa alterações ultraestruturais, principalmente na mitocôndria, que levam a morte do parasito, *in vitro*;
3. O (-)α-bisabolol é capaz de destruir as formas amastigotas intracelulares sem apresentar citotoxicidade evidente nas células hospedeiras, na concentração de 8.07µg/mL *in vitro*;
4. O tratamento tópico com o (-)α-bisabolol não demonstrou alterações hematológicas nem bioquímicas (hepáticas e renais), nas diferentes concentrações utilizadas nos ensaios *in vivo*;
5. O tratamento tópico utilizando as formulações contendo o (-)α-bisabolol reduziu o tamanho das lesões, promovendo sua cicatrização, nos grupos tratados com 1.000 mg/Kg/dia e 500 mg/Kg/dia;
6. O tratamento tópico utilizando a formulação de 250 mg/Kg/dia de (-)α-bisabolol promoveu a resolução parcial das lesões dos animais tratados com essa concentração;
7. A maior concentração de (-)α-bisabolol, 1.000 mg/Kg/dia, demonstrou a melhor atividade leishmanicida e não apresentou atividade citotóxica evidente *in vivo*;
8. Em conjunto, os dados aqui apresentados apontam potencial promissor do (-)α-bisabolol como fármaco para o tratamento tópico da leishmaniose tegumentar, e conferem elementos básicos para futuras modificações em sua formulação e/ou no protocolo de tratamento que aumentem sua eficácia.

7. Referências bibliográficas

Abahusein A, Larbi EB, Khawajah A, Gindan Y, Jain S. Evaluation of topical ketoconazole in cutaneous leishmaniasis. *East. Afr. Med. J.* 1992, 69:14-17.

Alvar J. et al. Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence. *Plos One.* 2012, V. 7, n. 5: 35671.

Anvisa. Guia de Controle de Qualidade de Produtos Comésticos. Uma abordagem sobre os ensaios físicos e químicos. Revista – Brasília. 2008, 2ª edição. Acesso em 20/01/2012; http://www.anvisa.gov.br/cosmeticos/material/guia_cosmetico.pdf.

Arruda DC, Miguel DC, Yokoyama-Yasunaka JKU, Katzin AM., Uliana SRB. Inhibitory activity of limonene against *Leishmania* parasites *in vitro* and *in vivo*. *Biomedicine & Pharmacotherapy.* 2009, 63: 643-9.

Asilian A, Jalayer T, Whitworth JAG, Ghasemi RL, Nilforoshzadeh M, Olliaro P. A randomized placebo-controlled trial of a two-week regimen of aminosidine (Paromomycin) ointment for treatment of cutaneous leishmaniasis in Iran. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 1995, 53:648-651.

Bakkali F, Averbeck S, Averbeck D, Idaomar M. 2008. Biological effects of essential oils – A review. *Food and Chemical Toxicology* 46: 446-75.

Bell SA, Schaller M & Röcken M. Occlusive paramomycin for cutaneous leishmaniasis [letter]. *The Lancet.* 1997, 349:29.

Bezerra SB, Leal LKAM., Nogueira NAP, Campos AR. Bisabolol-induced gastroprotection against acute gastric lesions: role of prostaglandins, nitric oxide, and K^+_{ATP} channels. *J Med Food.* 2009, 12:(6) 1403– 6.

Blum JA & Hatz C. Treatment of cutaneous leishmaniasis in travelers 2009. *J of Travel Medicine.* 2009, Vol. 16 (Issue 2): 123-131.

Brenzan MA, Nakamura CV, Filho BPD, Ueda-Nakamura T, Young MCM, Cortez DAG. Antileishmanial activity of crude extract and coumarin from *Calophyllum brasiliense* leaves against *Leishmania amazonensis*. *Parasitol Res.* 2007, 101:715– 22.

Castro GA, Nascimento DS, Nunan EA, Fernandes AP, Ferreira LAM. *In vitro* skin permeation of paromomycin from topical formulations across normal and stripped hairless mouse skin. *S. T. P. Pharma Sciences*. 2003, 13: 203-208.

Chan-Bacab MJ & Peña-Rodríguez LM. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Nat. Prod. Rep.* 2001, 18: 674–688.

Chávez-Fumagalli MA, Ribeiro TG, Castilho RO, Fernandes SOA, Cardoso VN, Coelho CSP, Mendonça DVC, Soto M, Tavares CAP, Faraco AAG, Coelho EAF. New delivery systems for amphotericin B applied to the improvement of leishmaniasis treatment. *Ver. Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2015, 48 (3): 235-242.

Couto DV, Medeiros MZ, Barbosa AB, Filho GH, Vicari CFS, Takita LC. American tegumentary leishmaniasis - a case of therapeutic challenge. *An Bras Dermatol*. 2014, 89: 974-976.

Croft SL, Shyam S, Fairlamb AH. Drug resistance in leishmaniasis. *Clinical Microbiology*. 2006, Vol. 19: 111-126.

Corpas-López V, Morillas-Márquez F, Navarro-Moll C, Merino-Espinosa G, Díaz-Sáez V and Martín-Sánchez J. (-)- α -Bisabolol, a promising oral compound for the treatment of visceral leishmaniasis. *Journal of Natural Products*. 2015, 78, 1202–1207.

El-On J, Jacobs GP, Witztum E, Greenblatt CL. Development of topical treatment for cutaneous leishmaniasis caused by *Leishmania tropica* in experimental animals. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 1984, 26: 745-751.

El-On J, Livshin R, Even-Paz, Z & Hamburger D. Topical treatment of cutaneous leishmaniasis. *J.Invest.Dermatol*. 1986, 87:284-288.

Filippin FB & Souza LC. Eficiência terapêutica das formulações lipídicas de anfotericina B. *Brazilian Journal of Pharmaceutical Sciences*. 2006, vol. 42, 2: 167-194.

Frézard Frédéric, Demicheli Cynthia and Ribeiro Raul R. Pentavalent Antimonials: New Perspectives for Old Drugs. *Molecules*. 2009, 14: 2317-2336.

Gazanion E, Vergnes B, Severo M, Garcia D, Oury B, Ait-oudhia K, Ouaisi A, Sereno D. *In vitro* activity of nicotinamide/ antileishmanial drug combinations. *Parasitology International*. 2011, 60: 19-24.

Gomes-Carneiro MR., Dias DMM., de-Oliveira ACAX. Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of α -bisabolol in the *Salmonella*/microsome assay. *Mutation Research*. 2005, 585: 105-12.

Gonçalves G. S., Fernandes A. P., Souza R. C. C., Cardoso J. E., Oliveira-Silva F., Maciel F. C., Rabello A., Ferreira L. A. M. Activity of a paromomycin hydrophilic formulation for topical treatment of infections by *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis*. *Acta Tropica*. 2005. 93, 161-167.

Goto H & Lindoso JAL. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 2010, 8: (4) 419–33.

Guimarães LRC, Rodrigues APD, Marinho PSB, Muller AH, Guilhon GMS, Santos LS, Nascimento JLM, Silva EO. Activity of the julocrotine, a glutarimide alkaloid from *Croton pullei* var. *glabrior*, on *Leishmania (L.) amazonensis*. *Parasitol Res.* 2010, 107:1075–81.

Handman Emanuela & Bullen Denise V. R. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends in Parasitology*. 2002, Vol.18 No.8.

Herwaldt BL. Leishmaniasis. *Lancet* 1999, 354:1191-1199.

Hojatia M, Modarres-Sanavya SAM, Ghanatib F, Panahic M. Hexaconazole induces antioxidant protection and apigenin-7-glucoside accumulation in *Matricaria chamomilla* plants subjected to drought stress. *Journal of Plant Physiology*. 2010, 15: (8) 782-91.

Honigberg B M. Evolutionary and systematic relationships in the flagellate order Trichomonadida Kirby. *J Protozool.* 1963: 10; 20-63.

Honigberg BM. Evolutionary and systematic relationships in the flagellate order Trichomonadida Kirby. *J Protozool.* 1963, 10: 20-63.

Kadir R & Barry BW. α -Bisabolol, a possible safe penetration enhancer for dermal and transdermal therapeutics. *Intern J of Pharmaceutics*. 1991, 70: (31) 87-94.

Kaur G & Rajput B. Comparative analysis of the omics technologies used to study antimonial, amphotericin B and Pentamididine resistance in *Leishmania*. Journal of Parasitology Research. 2014: 1-11.

Kaur S, Chauhan K and Sachdeva H. Protection against experimental visceral leishmaniasis by immunostimulation with herbal drugs derived from *Withania somnifera* and *Asparagus racemosus*. Journal of Medical Microbiology. 2014, 63: 1328-1338.

Lima MRF, Ximenes ECP, Luna A, Josiane S, Goulart Sant'Ana AE. The antibiotic activity of some Brazilian medicinal plants. Brazilian Journal of Pharmacognosy. 2006, 16: (3) 300 - 306.

Mahmoudvand H, Ezzatkhah F, Sharififar F, Sharifi I, Dezaki ES. Antileishmanial and Cytotoxic Effects of Essential Oil and Methanolic Extract of *Myrtus communis* L. Korean J Parasitol. 2015. 53, 21-27.

Masmoudi A, Hariz W., Marrekchi S., Amouri M., Turki H. Old World cutaneous leishmaniasis: diagnosis and treatment. Journal Dermatol. Case Rep. 2013, 2: 31-41.

Maurya AK, Singh M, Dubey V, Srivastava S, Luqman S and Bawankule DU. α -(-)-bisabolol reduces pro-inflammatory cytokine production and ameliorates skin inflammation. Current Pharmaceutical biotechnology. 2014, 15: 15, 173-181.

Mears ER, Modabber F, Don R, Johnson GE. A review: The Current *in vivo* models for the discovery and utility of new anti-leishmanial drugs targeting cutaneous leishmaniasis. Plos Neglected Tropical Diseases. 2015, September, 3, 1-23.

Medeiros MGF, Silva AC, Citó AMGL, Borges AR, Lima SG, Lopes JAD, Figueiredo RCBQ. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. Parasitol Int. 2011, 60: 237-241.

Mendonça MG, de Brito ME, Rodrigues EH, Bandeira V, Jardim ML, Abath FG. Persistence of leishmania parasites in scars after clinical cure of American cutaneous leishmaniasis: is there a sterile cure? J Infect Dis. 2004, 15; 189(6):1018-23.

Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde; 2003.

Mishra BB, Kale RR., Singh RK., Tiwari VK. Alkaloids: Future prospective to combat leishmaniasis. *Fitoterapia*. 2009, 80: 81-90.

Monzote L, Montalvo AM, Scull R, Miranda M, Abreu J. Activity, toxicity and analysis of resistance of essential oil from *Chenopodium ambrosioides* after intraperitoneal, oral and intralesional administration in BALB/c mice infected with *Leishmania amazonensis*: A preliminary study. *Biomedicine & Pharmacotherapy*. 2007, 61: 148-153.

Monzote L., García M., Montalvo A. M., Scull R., Miranda M. and Abreu J. In Vitro Activity of an Essential Oil against *Leishmania donovani*. *Phytotherapy Research*. 2007, 21: 1055–1058.

Morais-Teixeira E, Gallupo MK, Rodrigues LF, Romanha AJ, Rabello A. *In vitro* interaction between paromomycin sulphate and four drugs with leishmanicidal activity against three New World *Leishmania* species. *J Antimicrob Chemother*. 2013, August 22: 1-5.

Morales-Yuste M, *et al.*, Activity of (-) α - bisabolol against *Leishmania infantum* promastigotes. *Phytomedicine*; 2010, 17: 279-281.

Morgado FN, Schubach A, Rosalino CMV, Quintella LP, Santos G, Salgueiro M and Conceição-Silva F. Is the *in situ* inflammatory reaction an important tool to understand the cellular immune response in American tegumentary leishmaniasis? *British Journal of Dermatology*. 2008: 158, 50-58.

Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG. Advances in leishmaniasis. *Lancet* 2005, 366:1561-1577.

Neves DBJ, Caldas ED, Sampaio RNR. Antimony in plasma and skin of patients with cutaneous leishmaniasis – relationship with side effects after treatment with meglumine antimoniate. *Tropical Medicine and International Health*. 2009, 12: 1515-22.

Nibret E & Wink M. Trypanocidal and antileukaemic effects of the essential oils of *Hagenia abyssinica*, *Leonotis ocymifolia*, *Moringa stenopetala*, and their main individual constituents. *Phytomedicine*. 2010, 17: 911-20.

Nilforoushzadeh MA, Shirani-Bidabadi L, Zolfaghari-Baghbaderani A, Jafari R, Heidari-Beni M, Siadat AH and Ghahraman-Tabrizi M. Topical effectiveness of different concentrations of nanosilver solution on *Leishmania major* lesions in Balb/c mice. *J. Vector Borne Dis*. 2012. 49: 249-253.

Pauli Alexander. α -bisabolol from chamomile - A specific ergosterol biosynthesis inhibitor? *The International Journal of Aromatherapy*. 2006. 16, 21–25.

Pupo JA. Leishmaniose tegumentar. *Epidemiologia, profilaxia e tratamento da leishmaniose*. *Scientia Medica* 1926, 4: 387-409.

Rath S, Trivelin LA, Imbrunito TR, Tomazela DM, de Jesús MN e Marzal PC. Antimoniais empregados no tratamento da leishmaniose: Estado da arte. *Quim. Nova*. 2003, Vol. 26, No. 4, 550-555.

Rezende, JM. À sombra do plátano: crônicas de história da medicina. São Paulo: Editora Unifesp, 2009. Gaspar Vianna, mártir da ciência e benfeitor da humanidade. pp. 359-362. ISBN 978- 85-61673-63-5. Acesso: <http://books.scielo.org> em 09/09/2015.

Romagnoli C, Baldisserotto A, Malisardi G, Vicentini CB, Mares D, Andreotti E, Vertuani S and Manfredini S. A multi-target approach toward the development of novel candidates for antidermatophytic activity: ultrastructural evidence on α -bisabolol-treated *Microsporum gypseum*. *Molecules* 2015, 20, 11765-11776.

Romero GAS, Vela JSA & Marsden PD. Uso de tártaro emético tópico na leishmaniose cutânea. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop*. 1996, 29: 377.

Ross R. Further notes on Leishman's bodies. *Br Med J*. 1903;11:1401.

Rottini MM, Amaral ACF, Ferreira JLP, Silva JRA, Taniwaki NN, Souza CSF, d'Escoffier LN, Almeida-Souza F, Haridoim DJ, Costa SCG, Calabrese KS. *In vitro* evaluation of (-) α -bisabolol as a promising against *Leishmania amazonensis*. *Experimental Parasitology*. 2015, 148: 66-72

Sacks DL & Perkins PV. Development of infective stage *Leishmania* promastigotes within phlebotomine sand flies. *Am J Trop Med Hyg*. 1985, 34 (3): 456-459.

Santin MR, Santos AO, Nakamura CV, Filho BD, Ferreira ICP, Ueda-Nakamura T. *In vitro* activity of the essential oil of *Cymbopogon citratus*. *Parasitol Res*. 2009, 105:1489–1496.

Schenkel EP, Gosmann G, Petrovick. *Farmacognosia: da planta ao medicamento. Produtos de origem vegetal e o desenvolvimento de medicamentos*. 5nd ed., UFRGS/Editora da UFSC, Porto Alegre/Florianópolis. 2004, 524 pp.

Singh N, Kumar M, Singh RK. Leishmaniasis: Current status of available drugs and new potential drug targets. *Asian. Pacific. Journal of Tropical Medicine*. 2012, 485-497.

Soto J, Hernandez N, Mejia H, Grogl M, Berman J. Successful treatment of New World cutaneous Leishmaniasis with a combination of topical romomycin/methylbenzothonium chloride and injectable meglumine antimoniate. *Clin. Infect. Dis*. 1995, 20:47-51.

Tarikua Y, Hymeteb A, Hailuc A, Rohloff J. *In vitro* Evaluation of Antileishmanial Activity and Toxicity of Essential Oils of *Artemisia absinthium* and *Echinops kebericho*. *Chemistry & Biodiversity*. 2011, 8: 614-23.

Tiuman TS, Santos AO, Ueda-Nakamura T, Filho BPD, Nakamura CV. Recent advances in leishmaniasis treatment. *International Journal of Infectious Diseases*. 2011, 525-532.

Ueda-Nakamura T, Mendonça-Filho RR, Morgado-Díaz JA, Maza PK, Filho BPD, Cortez DAG, Alviano DS, Rosa MSS, Lopes AHCS, Nakamura CV. Antileishmanial activity of Eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. *Parasitology Int*. 2006, 55: 99 – 105.

Van GA & Vervoort T. Chemotherapy of leishmaniasis and trypanosomiasis. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 1997, 10: 469-474.

Wink Michael. Evolutionary advantage and molecular modes of action of multi-component mixtures used in phytomedicine. *Current Drug Metabolism*. 2008, 9: 996-1009.

World Health Organization - WHO. Leishmania and HIV in gridlock. WHO/UNAIDS. CDT/LEISH.98.9 Add.I UNAIDS/98.23(1), 1998, 1-23. Geneve. Leishmaniasis in the world.

World Health Organization - WHO. Leishmaniasis. Acesso em 10/11/2015. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>.

8. Anexo



Full length article

In vitro evaluation of (–) α -bisabolol as a promising agent against *Leishmania amazonensis*



Mariana Margatto Rottini ^a, Ana Claudia Fernandes Amaral ^b, Jose Luiz Pinto Ferreira ^b, Jefferson Rocha de Andrade Silva ^c, Noemi Nosomi Taniwaki ^d, Celeste da Silva Freitas de Souza ^a, Luiz Ney d’Escoffier ^a, Fernando Almeida-Souza ^a, Daiana de Jesus Haroim ^a, Sylvio Celso Gonçalves da Costa ^a, Kátia da Silva Calabrese ^{a,*}

^a Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, RJ, Brazil

^b Laboratório de Plantas Mediciniais e Derivados, Farmanguinhos, FIOCRUZ, Manguinhos, RJ, Brazil

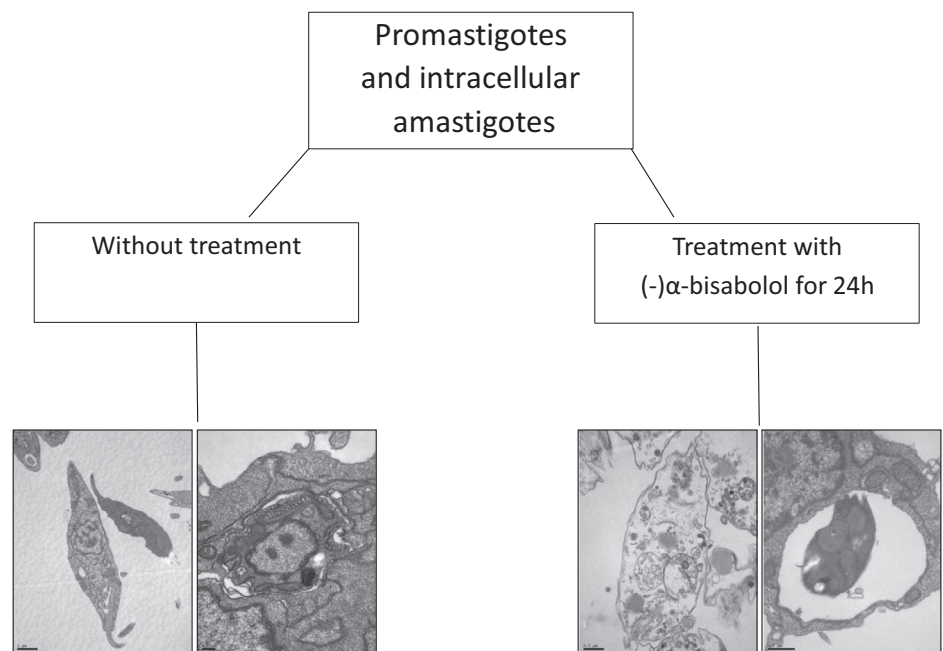
^c Lab. de Cromatografia, Departamento de Química, UFAM, Manaus, AM, Brazil

^d Núcleo de Microscopia Eletrônica, Instituto Adolfo Lutz, São Paulo, SP, Brazil

HIGHLIGHTS

- The (–) α -bisabolol is a sesquiterpene alcohol found in essential oils of plants.
- Antileishmanial activity of (–) α -bisabolol against *L. amazonensis* was evaluated.
- The (–) α -bisabolol showed cytotoxic effects *in vitro* against *L. amazonensis*.
- The (–) α -bisabolol at 8.07 μ g/ml reduces in 50% the survival index of promastigotes.
- The (–) α -bisabolol at 4.29 μ g/ml reduces in 50% the survival index of amastigotes.

GRAPHICAL ABSTRACT



* Corresponding author. Fax: +55 21 2562 1861.
E-mail address: calabrese@ioc.fiocruz.br (K. da Silva Calabrese).

ARTICLE INFO

Article history:

Received 7 December 2012
 Received in revised form 23 September 2014
 Accepted 1 October 2014
 Available online 5 November 2014

Keywords:

(-)- α -bisabolol
Leishmania amazonensis
 Promastigotes
 Cutaneous leishmaniasis

ABSTRACT

Current treatments for leishmaniasis present some difficulties due to their toxicity, the use of the intravenous route for administration and therapy duration, which may lead to treatment discontinuation. The aim of this study is to investigate new treatment alternatives to improve patients well being. Therefore, we evaluated the inhibitory effect of (-)- α -bisabolol, a sesquiterpene alcohol found in various essential oils of different plant species, against the promastigotes and intracellular amastigotes forms of *Leishmania amazonensis*, as well as the cytotoxic, morphological and ultrastructural alterations of treated cells. Promastigotes forms of *L. amazonensis* were incubated with (-)- α -bisabolol to determine the antileishmanial activity of this compound. The cytotoxicity effect was evaluated by testing against J774.G8 cells. After these tests, the infected and uninfected cells with *L. amazonensis* were used to determine if the (-)- α -bisabolol was able to kill intracellular parasites and to cause some morphological changes in the cells. The (-)- α -bisabolol compound showed significant antileishmanial activity against promastigotes with a 50% effective concentration of 8.07 μ g/ml (24 h) and 4.26 μ g/ml (48 h). Against intracellular amastigotes the IC₅₀ (inhibitory concentration) of (-)- α -bisabolol (24 h) was 4.15 μ g/ml. The (-)- α -bisabolol also showed a cytotoxic effect against the macrophage strain J774.G8. The value of 50% cytotoxic concentration was 14.82 μ g/ml showing that (-)- α -bisabolol is less toxic to macrophages than to the parasite. Ultrastructural studies of treated promastigotes and amastigotes showed several alterations, such as loss of cytoplasmic organelles, including the nucleus, and the presence of lipid inclusions. This study showed that (-)- α -bisabolol has promising antileishmanial properties, as it can act against the promastigote forms and is able to penetrate the cell, and is also active against the amastigote forms. About 69% of the promastigotes forms suffered mitochondrial membrane damage after treatment with IC₅₀ of (-)- α -bisabolol, suggesting inhibition of the metabolic activity of parasites. These results open new prospects for research that can contribute to the development of products based on essential oils or isolated compounds from plants for the treatment of cutaneous leishmaniasis.

© 2014 Elsevier Inc. All rights reserved.

1. Introduction

Leishmaniasis is considered as an emerging or re-emerging disease. There has been an alarming increase in incidence, especially during the last two decades (Goto and Lindoso, 2010). It is caused by the obligate intracellular parasites belonging to the order Kinetoplastida (Honigberg, 1963 emend. Vickerman, 1976) and family Trypanosomatidae (Doflein, 1901, emend. Grobber, 1905), genus *Leishmania* (Ross, 1903) and is transmitted to vertebrate hosts by sand fly vectors.

The cutaneous form of leishmaniasis is the most common and represents 50–75% of new cases reported (World Health Organization, 1998). The other forms of the disease are mucosal and visceral leishmaniasis (Herwaldt, 1999).

The main drugs for the treatment of leishmaniasis are the pentavalent antimonials and the second-line drugs include pentamidine and amphotericin B (Gadelha et al., 1990; Monzote et al., 2007). Although treatment with pentavalent antimony is usually effective the disadvantages of this treatment, such as, parenteral administration, treatment duration, toxic effects, contraindications for heart and renal diseases, high costs and parasite resistance should be considered (Mayrink et al., 2006; Monzote et al., 2007). Side effects are also observed in pentamidine and amphotericin B treatment, so their administration must also be carefully monitored by specialized medical services.

Due to numerous side effects and difficulties in dealing with the main drugs, there is a growing interest in the search for new antileishmanial agents that have fewer side effects (Chan-Bacab and Peña-Rodríguez, 2001; Morales-Yuste et al., 2010). This has promoted research into natural products with activity against protozoa. Thus, plants and/or their compounds are being used to treat certain diseases, especially skin diseases like cutaneous leishmaniasis (Monzote et al., 2007).

The (-)- α -bisabolol is a sesquiterpene alcohol found in various essential oils of different plants and because of its pleasant odor and pharmacological properties, it has been widely used in industry, in dermatology and cosmetic preparations (Gomes-Carneiro et al., 2005). Moreover, recent studies have demonstrated the leishmanicidal activity of (-)- α -bisabolol against

promastigote forms of *Leishmania infantum* (Morales-Yuste et al., 2010). Thus, this study aims to evaluate the antileishmanial activity of (-)- α -bisabolol against promastigotes and the intracellular amastigote stage of *L. amazonensis*, which causes cutaneous leishmaniasis.

2. Materials and methods

2.1. Parasites

The parasite strain used was MHOM/BR/76/Ma-76 *Leishmania amazonensis* isolated from a patient with diffuse cutaneous leishmaniasis, maintained by serial passages in BALB/c mice and periodically reisolated in culture. The strain was characterized by the isoenzyme technique and lecithin (Schottelius and Gonçalves da Costa, 1982). All experiments with animals were conducted in accordance with the guidelines for experimental procedures of Oswaldo Cruz Foundation (Licence n° L.0001/07).

2.2. Sesquiterpene

The purity of (-)- α -bisabolol (97%, Carl Roth, Karlsruhe, Germany) was determined by GC-FID and MS (conditions below). (-)- α -bisabolol was diluted in dimethyl sulfoxide (DMSO) and medium for the assays, as described below. Gas chromatographic analysis was performed using an Agilent 6890 gas chromatograph (GC) (Palo Alto, CA, USA) equipped with a flame ionization detector (FID) and a DB-5 (5% phenyl/95% dimethylpolysiloxane) fused silica capillary column (25 m \times 0.32 mm \times 0.25 μ m) and hydrogen was the carrier gas (1.0 ml min⁻¹). The injector temperature was kept at 250 °C and the oven temperature programmed from 70 to 280 °C at a rate of 10 °C min⁻¹. Detector (FID) was operated at 280 °C. The identity of the (-)- α -bisabolol was also verified by GC-MS (5973 Agilent), using helium as the carrier gas and the same conditions as above. One microliter of a 1% solution of the (-)- α -bisabolol in dichloromethane was injected in the splitless mode.

2.3. Antileishmanial activity

L. amazonensis amastigotes MHOM/BR/76/Ma-76 were isolated from BALB/c mice lesions and maintained as promastigote forms at 26 °C in LIBHIT medium containing 10% inactivated fetal bovine serum (FBS) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA), 100 µg streptomycin/ml and 100 U/ml penicillin (Sigma-Aldrich). The parasites (10⁶ parasites/ml) were incubated at 26 °C in LIBHIT, in the absence or presence of different concentrations of (–)α-bisabolol for 24 and 48 h in a 96-well plate. The number of parasites was determined by counting in a Neubauer chamber. The concentration that inhibited parasite growth by 50% (IC₅₀) was determined after 24 and 48 h by regression analysis using the Prism 5.0 software. Each assay was carried out in triplicate in three independent experiments.

2.4. Cytotoxicity assay

The neutral red accumulation assay was performed according to Borenfreund and Puerer (1985). Macrophages J774.G8 were plated at 1 × 10⁵ cells/well in 96-well microplates with DMEM medium, supplemented with 10% inactivated FBS and incubated for 2 h at 37 °C in 5% CO₂ to obtain confluent growth of the cells. A positive control (with Amphotericin B diluted from 4 to 0.12 µg/ml) and a negative control (without drugs) were included in each experiment. After 24 h the medium was removed, and different concentrations of (–)α-bisabolol (1.86–60 µg/ml) were added to each well containing the cells. Thereafter, the plates were incubated for 24 h. Cells were then washed and incubated with a culture medium containing 100 µg/ml of neutral red (NR) dye (Sigma), and the cells were incubated for 3 h. Then the neutral red medium was discarded and the cells were rinsed twice at 37 °C in PBS pH 7.4 in order to remove the non-incorporated dye. Then 100 µl of 50% ethanol and 1% acetic acid solution was added to each well to fix the cells releasing the neutral red into solution. The plates were shaken for 10 min, and solution absorbance in each well was measured in a Microplate Reader Benchmark at 540 nm, and compared with wells containing untreated cells. The absorbance of each individual well, minus the blank value, was calculated and then the percentage of viable cells in relation to controls cultured in the medium alone was determined. The 50% cytotoxic concentration (CC₅₀) was determined by regression analysis using the Prism 5.0 software. Each assay was carried out in triplicate in three independent experiments.

2.5. Murine macrophage culture and infection

To evaluate the effects of the (–)α-bisabolol on the intracellular *L. amazonensis* amastigote forms, resident macrophages were obtained after peritoneal injection of 5 ml of RPMI medium in BALB/c mice. Peritoneal exudate cells (1 × 10⁴ cells) were washed and plated onto glass coverslips placed with the wells of a 24-well plate containing complete culture DMEM medium supplemented with 10% inactivated FBS. Non-adherent cells were washed out and murine macrophages were cultivated in complete culture medium. Macrophages were infected with *L. amazonensis* MHOM/BR/76/Ma-76 in the stationary growth phase using a ratio 1:10 at 35 °C for 4 h. Cells were washed to remove non-internalized amastigotes. Thereafter macrophages were treated with several concentrations of (–)α-bisabolol (1.86–15 µg/ml) and incubated for 24 h. Then the cells were washed with PBS, fixed in methanol, and stained with Giemsa. The percentage of infected macrophages was determined by counting 100 cells in duplicate. The survival index was determined by multiplying the percentage of infected macrophages by the mean number of parasites per infected cell.

2.6. Transmission electron microscopy

Transmission electron microscopy was performed on promastigotes and intracellular amastigotes. The *L. amazonensis* promastigote forms were treated with (–)α-bisabolol (IC₅₀) or incubated with medium alone. After 2, 4, 8, 16 and 24 h-incubation the promastigotes were collected by centrifugation at 1500 g. The resident macrophages were infected by amastigote forms, and after 4 h they were washed to remove any non-internalized parasites, and treated with IC₅₀ of (–)α-bisabolol for 24 h. After that cells were processed as described hereafter. After being collected, the cells were washed in 0.01 M phosphate-buffered saline at pH 7.2, fixed in 2.5% glutaraldehyde in 0.1 M sodium cacodylate buffer at 4 °C and postfixed in a solution containing 1% osmium tetroxide and 0.8% potassium ferrocyanide in 0.1 M cacodylate buffer, washed in the same buffer, dehydrated in acetone, and embedded in Epon[®] resin. Ultrathin sections were stained with uranyl acetate and lead citrate. The promastigotes and intracellular amastigotes were examined in a Jeol 1011 transmission electron microscopy.

2.7. Flow cytometric analysis

Promastigote forms of *L. amazonensis* (1 × 10⁶ parasites) were incubated for 24 h at 26 °C with 8.07 µg/ml of (–)α-bisabolol (treated) or with culture medium (untreated). After this period the parasites were incubated with 50 nM Tetramethylrhodamine, Ethyl Ester (TMRE) (Molecular Probes, Carlsbad, CA, USA) for 15 min at room temperature in separate tubes. After this procedure, the samples were placed on ice and immediately analyzed on flow cytometric.

2.8. Data acquisition and analysis

The samples were analyzed in a FACSCalibur flow cytometer (Becton Dickinson, San Jose, CA, USA). The resultant fluorescence of TMRE was measured in the FL2 channel. The cell-Quest software Summit v4.3 was used for data acquisition and analysis. A total of 10,000 events were acquired in the region previously established as that of the parasites.

3. Results

The incubation of promastigotes of *L. amazonensis* with (–)α-bisabolol inhibited the parasite growth efficiently. The IC₅₀/24 h value was 8.07 µg/ml ± 0.09 (Fig. 1A) and the IC₅₀/48 h was 4.26 ± 0.23 (Fig. 1B). The value of 50% cytotoxic concentration on J774.G8 macrophages was of 14.82 µg/ml ± 0.12.

Intracellular amastigotes treated with the different (–)α-bisabolol concentrations caused a significant decrease (*p* < 0.01) in the survival index when compared with control (Fig. 2). According to the calculation made by the statistical Prism 5.0 software the concentration of (–)α-bisabolol necessary to reduce by 50% the survival index of intracellular amastigotes was 4.15 µg/ml ± 0.07. These results suggest that intracellular amastigotes were more sensitive to (–)α-bisabolol treatment than the promastigotes, suggesting that besides the direct action of (–)α-bisabolol there is also an indirect action through the activation of macrophages. Light microscopy analysis of macrophages showed that 99% of the infected non-treated cells had amastigotes in the parasitophorous vacuoles. The average of amastigotes inside vacuoles was 3.33%. On the other hand 86% of macrophages treated with 8.07 µg/ml of (–)α-bisabolol, the same concentration of IC₅₀ as to promastigotes, were infected with an average of 1.78 amastigotes per cell. This average was less than that observed in the infected but non-treated control cells (Fig. 3).

Electron microscopy analyses of treated and untreated *L. amazonensis* promastigotes and internalized amastigotes were

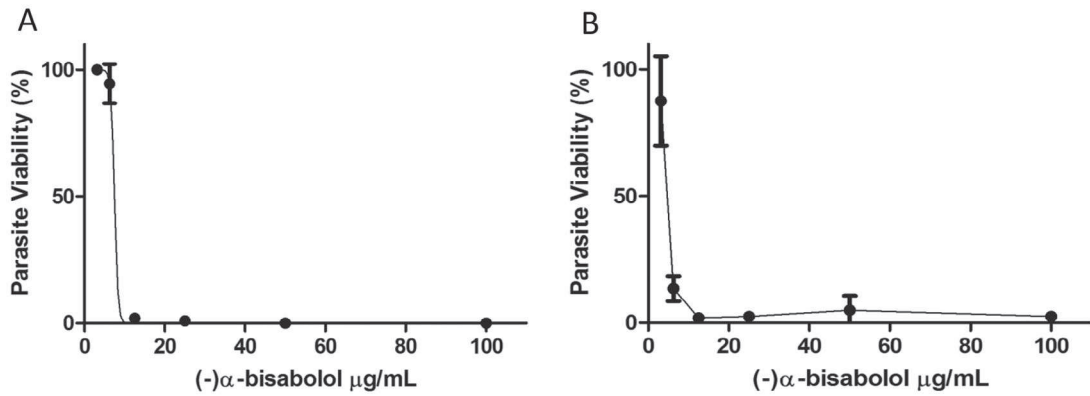


Fig. 1. Effects of (-)-α-bisabolol on *Leishmania amazonensis* promastigote forms. The line represents the mean ± standard deviation of three independent experiments carried out in triplicate. Viability of promastigote forms treated for 24 h (A) and 48 h (B), expressed in percentage.

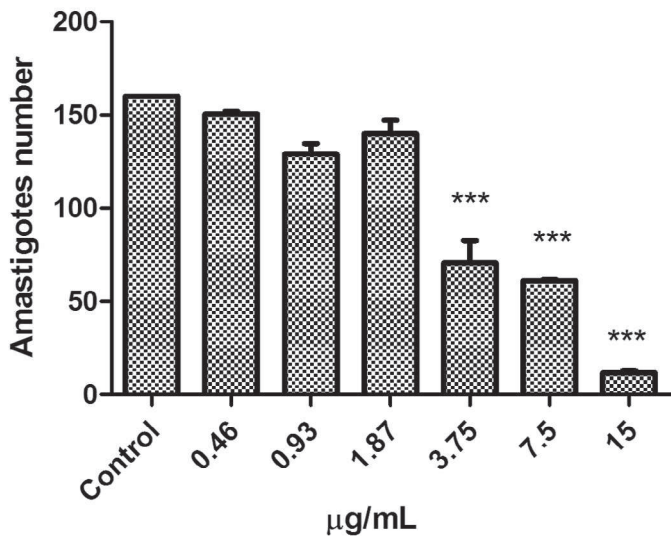


Fig. 2. Inhibition of intracellular amastigotes treated with (-)-α-bisabolol for 24 h in LIBHIT medium. Each column represents the numbers of intracellular amastigotes treated with different concentrations. The value represents the mean of three independent experiments in duplicate and calculated by regression analysis using the Prism 5.0 software.

performed in order to determine the ultrastructural changes caused by the (-)-α-bisabolol (IC₅₀ for promastigotes and amastigotes).

The ultrastructural analysis of *L. amazonensis* untreated promastigotes in Fig 4A shows the well-preserved cell morphology. Promastigotes treated with (-)-α-bisabolol for 2 h in Fig 4B showed no changes in cell shape; however, mitochondrial swelling with loss of cristae was noted. At this time a nuclear membrane alteration was also observed. After 4 h in Fig 4C of treatment numerous vacuoles were seen as well as lipid inclusions with different sizes, condensed mitochondrial matrix and nucleus with localization at the periphery. Parasites treated for 8 h, Fig 4D, also showed condensed mitochondrial matrix and lipid inclusions. Sixteen hours, Fig 4E, of treatment showed parasites with nuclear membrane detachment, chromatin condensation, lipid inclusions, loss of cytoplasm organelles, plasma membrane with detachment of the lipid bilayer and loss of microtubule organization. Finally 24 h after treatment in Fig 4F, the shape of parasite was preserved; however, there were an enhancement of plasma membrane blebs and severe damage of the cytoplasm.

Figure 5A and 5B of the untreated infected macrophages show the well-preserved ultrastructural morphology of the amastigotes. Infected macrophages treated with (-)-α-bisabolol showed ultrastructural alterations in the amastigotes, such as, the presence of

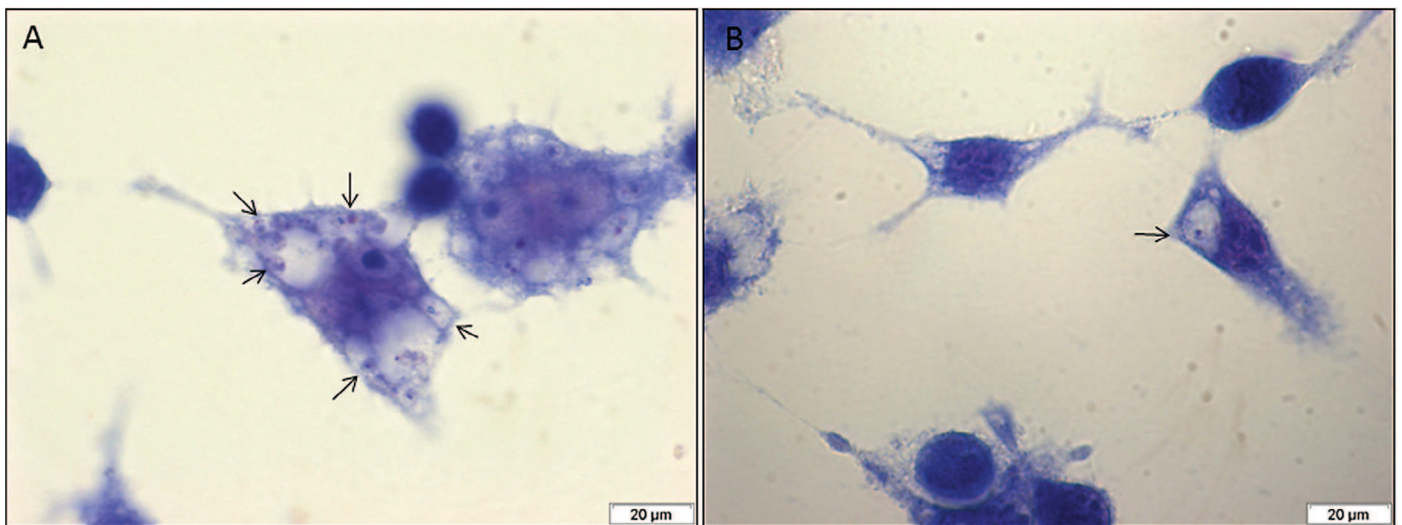


Fig. 3. Leishmanicidal activity against *Leishmania amazonensis* amastigotes in macrophages grown in DMEM at 37 °C in 5% CO₂. (A) *L. amazonensis* infected cells after 24 h of infection show the presence of numerous internalized amastigotes. (B) *L. amazonensis* infected cells treated for 24 h with (-)-α-bisabolol, using the same concentration used for the IC₅₀ promastigotes, showing few amastigotes.

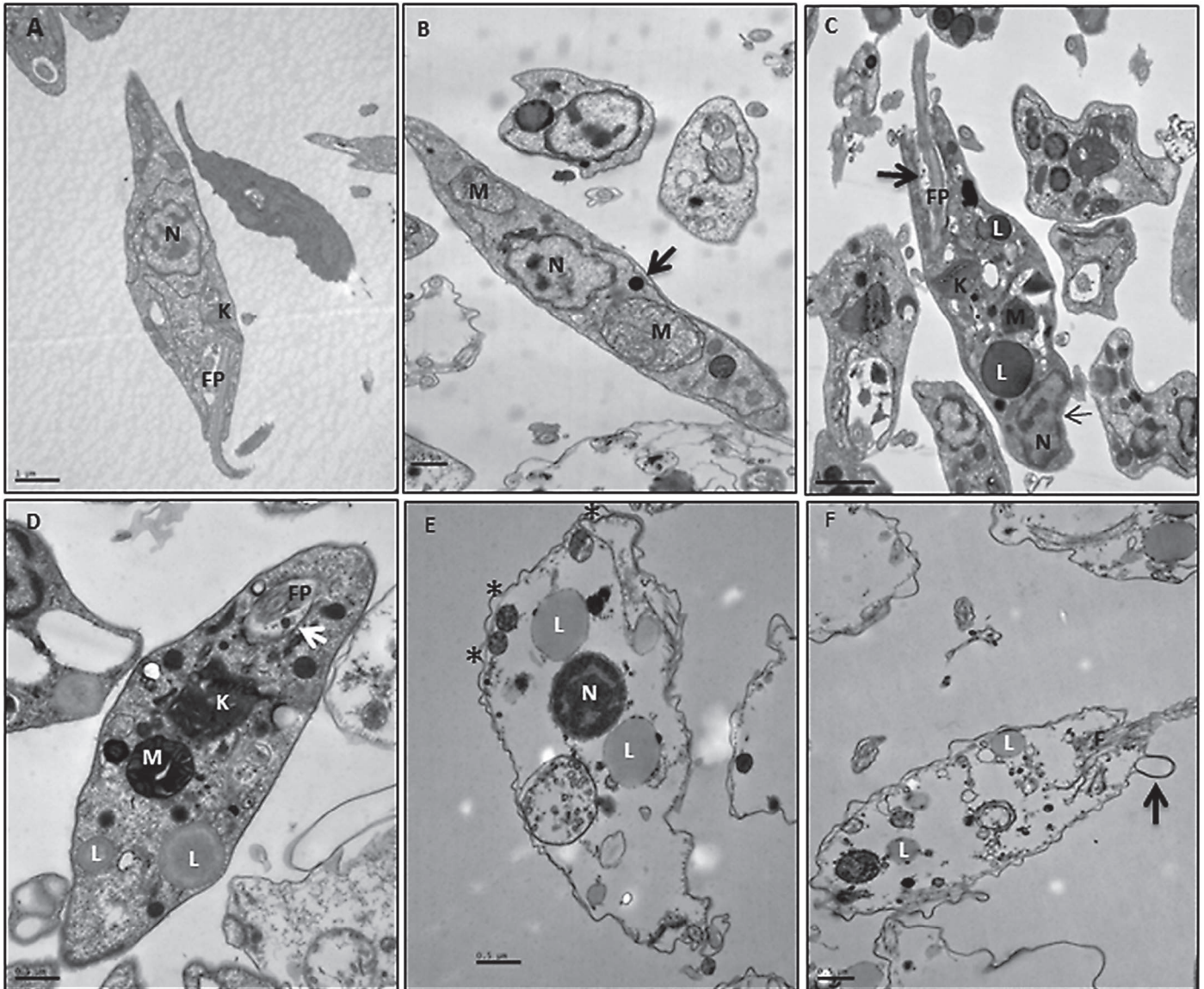


Fig. 4. Transmission electron microscopy of *Leishmania amazonensis* promastigote forms treated for different times with $(-)\alpha$ -bisabolol (8.07 $\mu\text{g}/\text{mL}$). (A) Untreated parasite, showing the characteristic structure of kinetoplasts (K), flagellar pocket (FP) and nucleus (N); (B) parasites treated for 2 h showing mitochondrial swelling (M) and electron-dense structures (large arrow); (C) 4 h of treatment showing cellular disorganization, enhancement of lipid droplets (L) in the cytoplasm and vesicles in the flagellar pocket (FP) (large arrow); (D) 8 h of treatment showing cellular disorganization and enhancement of lipid droplets (L) in the cytoplasm and condensed mitochondrial matrix (M), Kinetoplast damage (K) and vesicles in the flagellar pocket (FP) (white arrows); (E) 16 h of treatment showing enhancement of lipid droplets (L), chromatin condensation, detachment of lipid bilayer (asterisk), disruption of subpellicular microtubules and loss of cytoplasmic organelles; (F) 24 h of treatment showing plasma membrane with blebs (arrow) and severe damage to the cytoplasm.

vacuoles (V) in the cytoplasm, loss of mitochondria cristae, kinetoplast damage and shrinking of the parasites (Fig. 5C and D).

TMRE was used in order to demonstrate the existence of changes in the parasite mitochondrial permeability when treated with $(-)\alpha$ -bisabolol. The results of flow cytometry showed a disruption of 69.06% in the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) in promastigotes forms treated with IC_{50} of $(-)\alpha$ -bisabolol (Fig. 6C). On the other hand, the untreated promastigotes showed a decrease of about 17% in the mitochondrial $\Delta\Psi_m$ (Fig. 6B).

4. Discussion and conclusion

In this study we evaluated the activity of $(-)\alpha$ -bisabolol against *Leishmania*. Our interest was based on its antibacterial activity (Brehm-Stecher and Johnson, 2003) and *in vitro* action in *L. infantum* (Morales-Yuste et al., 2010).

Approximately 80% of the world population uses traditional medicines, primarily based on natural products (Gachet et al., 2010). Previous studies have shown the antileishmanial action of new drugs isolated from plants (Guimarães et al., 2010; Medeiros et al., 2011; Monzote et al., 2007; Morales-Yuste et al., 2010). The sesquiterpene alcohol $(-)\alpha$ -bisabolol has anti-inflammatory, anti-ulcerous and sedating activity on the central nervous system (Morales-Yuste et al., 2010) and is also able to increase the permeability of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* membranes as shown by Brehm-Stecher and Johnson (2003).

In our study the antileishmanial action of $(-)\alpha$ -bisabolol was confirmed against *L. amazonensis*, showing that this compound was able to inhibit promastigote growth in 50% – IC_{50} – in a concentration of 8.07 $\mu\text{g}/\text{mL}$. When tested against amastigote forms the $(-)\alpha$ -bisabolol inhibited the growth in 50% – IC_{50} – at a lower concentration of 4.15 $\mu\text{g}/\text{mL}$. These results suggested that intracellular amastigotes were

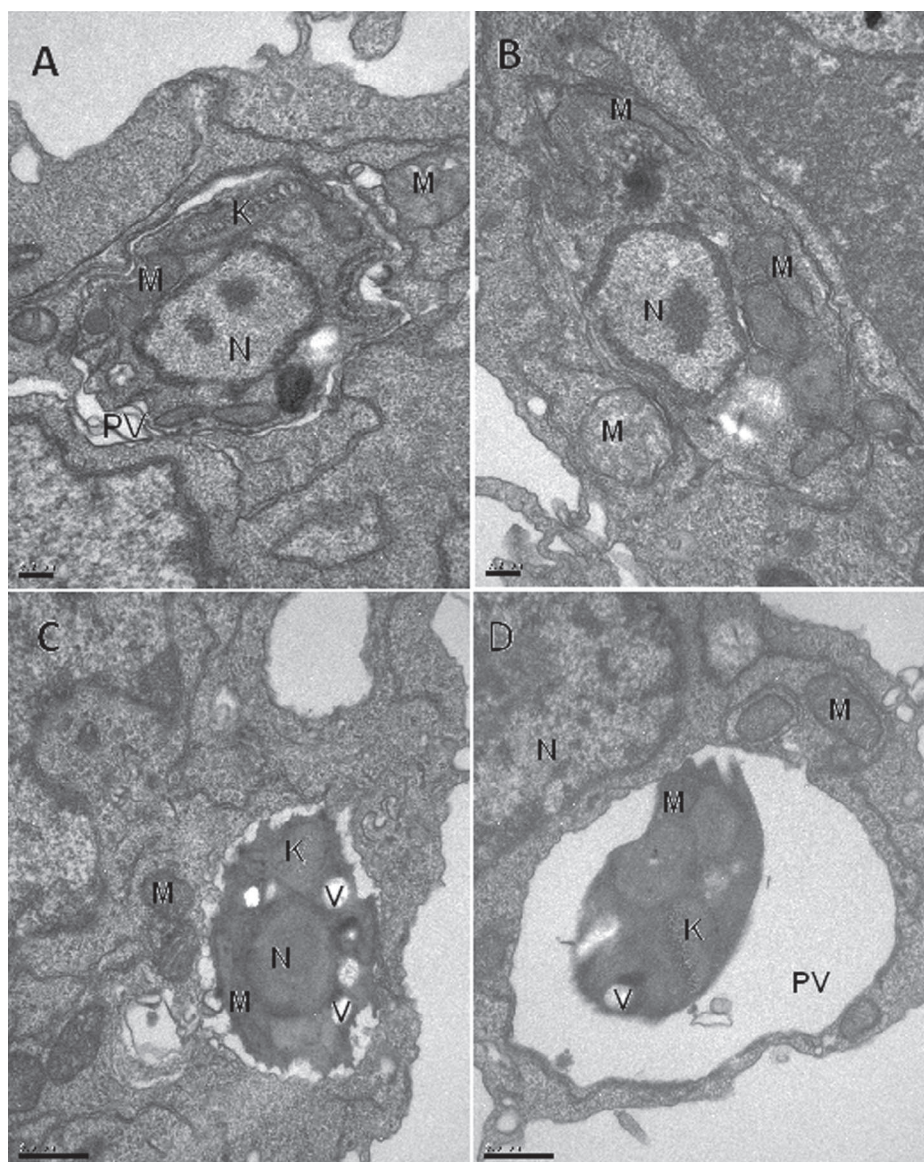


Fig. 5. Ultrastructural effects of $(-)\alpha$ -bisabolol on intracellular *Leishmania amazonensis* amastigotes. (A and B) Typical morphology of amastigotes in non-treated and infected macrophages; (C and D) Infected macrophages treated with $(-)\alpha$ -bisabolol showed ultrastructural changes in the amastigotes inside parasitophorous vacuoles and the presence of vacuoles (V) in the amastigote cytoplasm and kinetoplast shrinking.

more susceptible to being killed by $(-)\alpha$ -bisabolol treatment corroborating with Ueda-Nakamura et al. (2006) in their studies with *L. amazonensis* and essential oil from *Ocimum gratissimum*.

The efficient antileishmanial action of $(-)\alpha$ -bisabolol can be attributed to the presence of the hydroxyl group in this compound (Morales-Yuste et al., 2010; Wink, 2008). Besides this antileishmanial activity, we also showed that the $(-)\alpha$ -bisabolol can pass through the cell membrane and destroy the intracellular amastigotes without causing any change in the J774.G8 cells. This ability to pass through the promastigotes and amastigotes membrane is found in highly lipophilic components, such as compounds derived from plants. This feature can contribute to the toxic activity of these compounds against various microorganisms, such as *Leishmania*. When crossing the cell membrane, these compounds can lead to a loss of the impermeability to intracellular electrolytes, which can cause cell death (Medeiros et al., 2011).

According to recent studies, the changes in membrane permeability, particularly in the mitochondrial membrane, may lead

to parasite programmed death. The impairment of the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$) can be observed using TMRE. This dye is accumulated by healthy cells in the mitochondria, evidencing the mitochondrial potential (Mutai and Waitumbi, 2010; Salomão et al., 2013). Using this dye it was possible to show that the $(-)\alpha$ -bisabolol is able to cross the mitochondrial membrane, which can lead to parasite death. This result confirms the toxic effects of highly lipophilic compounds derived from plants, as demonstrated by Medeiros et al. (2011). The ability of $(-)\alpha$ -bisabolol to cross membranes is essential to its leishmanicidal activity, since *Leishmania spp.* is an obligate intracellular parasite. Therefore, the compound must cross both cell and parasite membranes in order to get to its target.

The first and most important morphological alteration observed in the promastigote forms treated for 2 h with $(-)\alpha$ -bisabolol was mitochondrial swelling, indicating damage and significant changes in this organelle. Similar swellings have been shown in *Leishmania sp* treated with the sesquiterpene Polygodial (Corrêa et al., 2011), and treated with Eupomatenoïd-5 (Vendrametto et al., 2010).

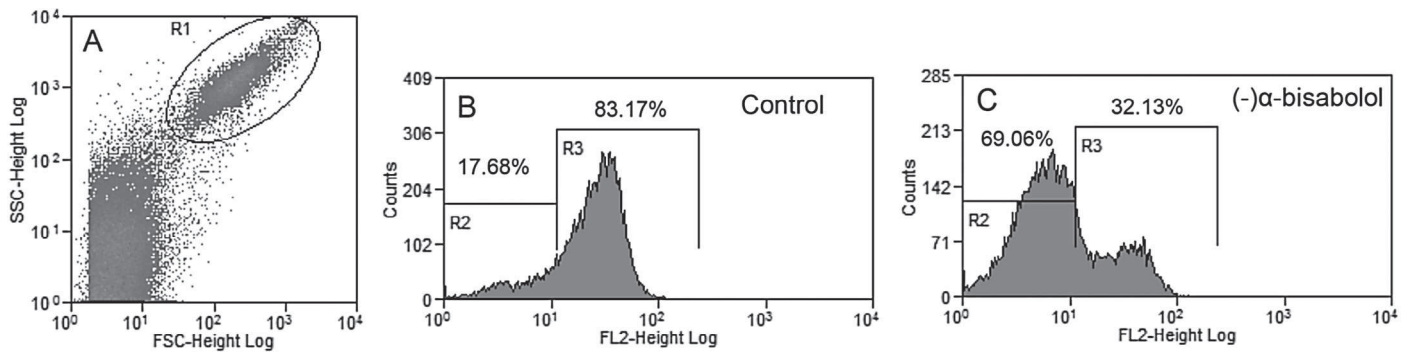


Fig. 6. Flow cytometry of *Leishmania amazonensis* to evaluate the mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi_m$). (A) Promastigotes captured in the gated region; (B) representative histograms of non-treated promastigotes incubated with TMRE; (C) promastigotes treated with 8.07 $\mu\text{g/ml}$ of $(-)\alpha$ -bisabolol for 24 h and incubated with TMRE. (B) In R3 it was possible to observe 83.17% of the mitochondria with their $\Delta\Psi_m$ preserved. In R2 it was possible to see changes in $\Delta\Psi_m$ of 17.68%. (C) In R3 we see 32.13% of mitochondria with their $\Delta\Psi_m$ preserved, while R2 shows 69.06% of treated parasites with their $\Delta\Psi_m$ disrupted.

Other cell alterations such as membrane damage, breakdown of subpellicular microtubules, presence of lipid inclusions, vesicular formations in the flagellar pocket, swelling of the kinetoplast and the loss of cytoplasmic organelles have been described in our study. Some of these changes were also described by Rodrigues et al. (2008) and Medeiros et al. (2011) in experiments with *Leishmania* and julocrotine or *Leishmania* and essential oil of *Lippia sidoides* Cham, respectively. The morphological alterations observed extended to other organelles and culminated with the total destruction of the parasites. As observed by other authors (Corrêa et al., 2011) these alterations were time dependent.

Another hypothesis to explain the death of the parasites is ergosterol biosynthesis inhibition by treatment with sesquiterpene. This fact has been reported by several authors attempting to explain the antileishmanial action of compounds derived from plants (Medeiros et al., 2011; Vendrametto et al., 2010).

In conclusion, the sesquiterpene alcohol $(-)\alpha$ -bisabolol showed cytotoxic effects *in vitro* against *L. amazonensis* promastigotes and amastigotes causing parasite destruction. Thus, it appears that $(-)\alpha$ -bisabolol could be explored for the development of new antileishmanial drugs. These results open new prospects for research that can contribute to the development of products based on compounds from plants for the treatment of cutaneous leishmaniasis.

Acknowledgments

This work was supported by CAPES and Oswaldo Cruz Institute. Kátia da Silva Calabrese (CNPq n° 306271/2011-7) and Sylvio Celso Gonçalves da Costa (CNPq n° 306130/2011-4) are seniors researchers. The authors thank the Plataforma de Citometria de Fluxo – Análise Multiparamétrica – IOC and the instrumental support given by Carl Zeiss of Brazil.

References

Borenfreund, E., Puermer, J.A., 1985. A simple quantitative procedure using monolayer culture for toxicity assays. *J. Tissue Cult. Methods* 9, 7–9.

Brehm-Stecher, B.F., Johnson, E.A., 2003. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoid nerolidol, farnesol, bisabolol, and apritone. *Antimicrob. Agents Chemother.* 47, 3357–3360.

Chan-Bacab, M.J., Peña-Rodríguez, L.M., 2001. Plant natural products with leishmanicidal activity. *Nat. Prod. Rep.* 18, 674–688.

Corrêa, D.S., Tempone, A.G., Reimão, J.Q., Taniwaki, N.N., Romoff, P., Fávero, O.A., et al., 2011. Anti-leishmanial and anti-trypanosomal potential of polygodial isolated

from stem barks of *Drimys brasiliensis* Miers (Winteraceae). *Parasitol. Res.* 109, 231–236.

Gachet, M.S., Lecaro, J.S., Kaiser, M., Brun, R., Navarrete, H., Munoz, R.A., et al., 2010. Assessment of anti-protozoal activity of plants traditionally used in Ecuador in the treatment of leishmaniasis. *J. Ethnopharmacol.* 128, 184–197.

Gadelha, A., Oliveira, W., Assunção, I., Dourado, H., 1990. Tratamento da leishmaniose tegumentar americana com a pentamidina, esquema em dose única intravenosa. *An. Bras. Dermatol.* 65, 198–200.

Gomes-Carneiro, M.R., Dias, D.M.M., De-Oliveira, A., Paumgarten, F.J.R., 2005. Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of alpha-bisabolol in the *Salmonella/microsome* assay. *Mutat. Res.* 585, 105–112.

Goto, H., Lindoso, J.A.L., 2010. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev. Anti Infect. Ther.* 8, 419–433.

Guimarães, L.R.C., Rodrigues, A.P.D., Marinho, P.S.B., Muller, A.H., Guilhon, G.M.S., Santos, L.S., et al., 2010. Activity of the julocrotine, a glutarimide alkaloid from *Croton pullei* var. *glabrior*, on *Leishmania (L.) amazonensis*. *Parasitol. Res.* 107, 1075–1081.

Herwaldt, B.L., 1999. Leishmaniasis. *Lancet* 354, 1191–1199.

Mayrink, W., Botelho, A.C.D., Magalhães, P.A., Batista, S.M., Lima, A.D., Genaro, O., et al., 2006. Immunotherapy, immunochemotherapy and chemotherapy for American cutaneous leishmaniasis treatment. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* 39, 14–21.

Medeiros, M.D.F., Silva, A.C., Cito, A.M.D.L., Borges, A.R., de Lima, S.G., Lopes, J.A.D., et al., 2011. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Parasitol. Int.* 60, 237–241.

Monzote, L., Montalvo, A., Scull, R., Miranda, M., Abreu, J., 2007. Combined effect of the essential oil from *Chenopodium ambrosioides* and antileishmanial drugs on promastigotes of *Leishmania amazonensis*. *Rev. Instit. Med. Trop. Sao Paulo* 49, 257–260.

Morales-Yuste, M., Morillas-Marquez, F., Martin-Sanchez, J., Valero-Lopez, A., Navarro-Moll, M.C., 2010. Activity of $(-)\alpha$ -bisabolol against *Leishmania infantum* promastigotes. *Phytomedicine* 17, 279–281.

Mutai, B.K., Waitumbi, J.N., 2010. Apoptosis stalks *Plasmodium falciparum* maintained in continuous culture condition. *Malar. J.* 9, 1–9.

Rodrigues, J.C., Concepcion, J.L., Rodrigues, C., Caldera, A., Urbina, J.A., Souza, W., 2008. In vitro activities of ER-119884 and E5700, two potent squalene synthase inhibitors, against *Leishmania amazonensis*: antiproliferative, biochemical, and ultrastructural effects. *Antimicrob. Agents Chemother.* 52, 4098–4114.

Ross, R., 1903. Note on the bodies recently described by *Leishman* and *Donovan*. *BMJ* 2, 1261–1262.

Salomão, K., De Santana, N.A., Molina, M.T., De Castro, S.L., Menna-Barreto, R.F.S., 2013. *Trypanosoma cruzi* mitochondrial swelling and membrane potential collapse as primary evidence of the mode of action naphthoquinone analogues. *BMC Microbiol.* 3, 1–12.

Schottelius, J., Gonçalves da Costa, S.C., 1982. Studies on the relationship between lectin binding carbohydrates and different strains of *Leishmania* from the New World. *Mem. Instit. Oswaldo Cruz* 77, 19–27.

Ueda-Nakamura, T., Mendonça, R.R., Morgado-Diaz, J.A., Maza, P.K., Dias, B.P., Cortez, D.A.G., et al., 2006. Antileishmanial activity of eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*. *Parasitol. Int.* 55, 99–105.

Vendrametto, M.C., Santos, A.O., Nakamura, C.V., Dias Filho, B.P., Cortez, D.A., Ueda-Nakamura, T., 2010. Evaluation of antileishmanial activity of eupomatenoide-5, a compound isolated from leaves of *Piper regnellii* var. *pallidescens*. *Parasitol. Int.* 59, 154–158.

Wink, M., 2008. Evolutionary advantage and molecular modes of action of multi-component mixtures used in phytomedicine. *Curr. Drug Metab.* 9, 996–1009.

World Health Organization, 1998. *Leishmania* and HIV in Gridlock. WHO/UNAIDS, pp. 1–23. CDT/LEISH.98.9.1998 Add.1 UNAIDS/98.23.