

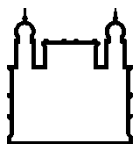
MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Mestrado em Medicina Tropical

ATIVIDADE DE (-)- α -BISABOLOL CONTRA *Leishmania infantum* EM
CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO CANINO

LUZILENE MARIA DE SOUZA

Rio de Janeiro
Agosto de 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Luzilene Maria de Souza

Atividade de (-)- α -bisabolol contra *Leishmania infantum* em células mononucleares de sangue periférico canino

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

Orientadores: Profa. Dra. Kátia da Silva Calabrese
 Prof. Dr. Fernando Almeida de Souza

RIO DE JANEIRO

Agosto de 2018

Maria de Souza, Luzilene .

Atividade de (-)- α -bisabolol contra *Leishmania infantum* em células mononucleares de sangue periférico canino / Luzilene Maria de Souza. - Rio de Janeiro, 2018.

63 f.; il.

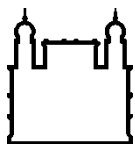
Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2018.

Orientadora: Kátia da Silva Calabrese.

Co-orientador: Fernando Almeida de Souza.

Bibliografia: f. xii-48

1. Doenças do cão. 2. Zoonoses. 3. Terapia. 4. Leishmaniose visceral. I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ
Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

Luzilene Maria de Souza

**ATIVIDADE DE (-)- α -BISABOLOL CONTRA *Leishmania infantum* EM CÉLULAS
MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO CANINO**

ORIENTADORES: Prof. Dra. Kátia da Silva Calabrese
Prof. Dr. Fernando Almeida de Souza

Aprovada em: 10/08/2018

EXAMINADORES:

Prof. Dr. André Luiz Rodrigues Roque – IOC/FIOCRUZ (Presidente)
Prof^a. Dra. Silvia Amaral Gonçalves da Silva - UERJ
Prof. Dr. Igor de Almeida Rodrigues – UFRJ
Prof^a. Dra. Raquel Peralva Ribeiro – IOC/FIOCRUZ (suplente)
Prof. Dr. Alexandre Ribeiro Bello – UERJ (suplente)

Rio de Janeiro, 10 de Agosto de 2018.

AGRADECIMENTOS

A Deus, pelas graças concedidas todos os dias, que por meio delas foi permitido concluir esta etapa, bem como alicerçar-me para as futuras.

Ao Instituto Oswaldo Cruz/ Fundação Oswaldo Cruz que me proporcionou o estudo e o aprendizado sobre leishmaniose em cães.

À equipe de coordenação do curso de mestrado em Medicina Tropical.

À minha orientadora Dra. Kátia da Silva Calabrese pelo modelo de pesquisadora, pelo conhecimento compartilhado e amizade sincera.

Ao meu orientador Dr. Fernando Almeida de Souza; pela motivação e autenticidade. Pela riqueza dos ensinamentos repassados e pelo ganho profissional obtido durante todo o período do curso; meu sincero respeito e admiração.

Ao Dr. Miguel Ângelo pela colaboração com o estudo disponibilizando as bolsas de sangue dos cães.

À Dra. Celeste Freitas de Souza, pela competência, empenho e suporte indispensável a todos os alunos.

À Dra. Tânia Zaverucha do Valle, Luís Ney d'Scoffier e Luís Otávio Pereira Carvalho pela dedicação em suas funções sempre nos motivando a trabalhar com pesquisa.

A todos os colaboradores do Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia. Aos mestres João Victor Silva e Silva, Sandy Santos Pereira, Daiana Haroim, Yasmim Rizk e Iasmim Cristiane Souza; Henrique Previtalli e aos futuros mestres Juan Fernandes, e Mariana Nabucco.

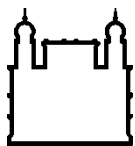
Aos alunos visitantes da Universidade Estadual do Maranhão pelas experiências compartilhadas.

À Dra. Flávia Oliveira Cardoso pelo seu dom de ensinar e cativar a todos aqueles que têm a oportunidade de acompanhá-la e de serem orientados por ela.

Enfim, gratidão a todos que contribuíram para a concretização e finalização de todos os experimentos.

Dedico esta dissertação aos meus irmãos cúmplices José Roberto, Luzimeire, Lusiane, Angélica e Auzira.

...”Todas as boas qualidades devem ser amadas, porque amando-as você incorpora um pouco delas.”



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ATIVIDADE DE (-)- α -BISABOLOL CONTRA *Leishmania infantum* EM CÉLULAS MONONUCLEARES DE SANGUE PERIFÉRICO CANINO

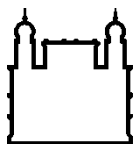
RESUMO

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO EM MEDICINA TROPICAL

Luzilene Maria de Souza

No Brasil, o Milteforan[®] é o único produto autorizado para o tratamento da leishmaniose visceral canina (LVC). Entretanto, apresenta um alto custo, longo período de tratamento e riscos de toxicidade ao animal, dessa forma, a busca por novas alternativas terapêuticas torna-se contínua. Estudos com produtos naturais vêm apresentando resultados promissores, sobretudo contra *Leishmania infantum*. Estudos mostram que o (-)- α -bisabolol tem um efeito leishmanicida e que esse composto pode ser um bom candidato a ser integrado no painel de drogas para o tratamento das leishmanioses. O objetivo do presente estudo foi avaliar a atividade do (-)- α -bisabolol, um sesquiterpeno presente em óleos essenciais de diversas plantas, contra formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. infantum*. Foram determinadas as concentrações inibitórias (IC) do (-)- α -bisabolol contra formas promastigotas e formas amastigotas intracelulares de *L. infantum* por meio de contagem em câmara de Neubauer, bem como foram avaliadas as alterações ultraestruturais ocasionadas pelo tratamento, por microscopia eletrônica de transmissão (MET). A concentração citotóxica (CC) do composto em células mononucleares de sangue periférico (PBMC) canino e células DH82. Em todos os experimentos foram utilizados controles sem tratamento ou tratados com miltefosina. O (-)- α -bisabolol e a miltefosina não apresentaram toxicidade para as PBMC (CC₅₀>1080 μ M). Para as células DH82 tratadas com (-)- α -bisabolol a concentração citotóxica foi de $556,5 \pm 1,253 \mu$ M e para miltefosina foi $170,2 \pm 1,268 \mu$ M. O (-)- α -bisabolol provocou inibição do crescimento de promastigotas com IC₅₀ de $117,5 \pm 1,291 \mu$ M (24h), $35,73 \pm 1,076 \mu$ M (48h) e $31,02 \pm 1,161 \mu$ M (72h), enquanto a miltefosina apresentou IC₅₀ de $4,8 \pm 1,080 \mu$ M (24h), $9,5 \pm 1,198 \mu$ M (48h) e $8,6 \mu$ M $\pm 1,253$ (72h). Em relação à infecção intracelular de PBMC houve diminuição do crescimento de formas amastigotas em 50% na concentração de $34,76 \pm 1,265 \mu$ M (24h) nas células tratadas com (-)- α -bisabolol e o grupo tratado com miltefosina apresentou IC₅₀ de $30,57 \pm 1,596 \mu$ M. As análises ultraestruturais das promastigotas revelaram como principais alterações a vacuolização citoplasmática, inclusões lipídicas, membranas eletrondensas dispersas no citoplasma, desorganização celular e perda da morfologia estrutural do parasito. O presente estudo demonstrou a efetividade in vitro do (-)- α -bisabolol contra *L. infantum* o que nos fornece fundamentos básicos para posteriores estudos in vivo.

Palavras-chave: leishmaniose visceral, doenças do cão, leishmaniose visceral canina, tratamento.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

ACTIVITY OF (-)- α -BISABOLOL AGAINST *Leishmania infantum* IN CANINE PERIPHERICAL BLOOD MONONUCLEAR CELLS

ABSTRACT

MASTER DISSERTATION IN MEDICINA TROPICAL

Luzilene Maria de Souza

In Brazil, Milteforan® is the only authorized product for the treatment of canine visceral leishmaniasis (CVL). However, it presents high cost, long period of treatment and toxicity risks to the animal. Therefore, the search for new alternative therapeutics is constant. Studies with natural products have shown promising results, especially against *Leishmania infantum*. Researches show that (-)- α -bisabolol has a leishmanicidal effect and this compound may be a good candidate to be integrated into the drugs panel for the leishmaniasis treatment. The objective of the present study was to evaluate the (-)- α -bisabolol activity, a sesquiterpene present in essential oils of several plants, against promastigotes and intracellular amastigotes of *L. infantum*. Inhibitory concentrations (IC) of (-)- α -bisabolol against *L. infantum* promastigote and intracellular amastigotes forms were determined by Neubauer method. Ultrastructural changes caused by the treatment were observed by transmission electron microscopy (TEM). The compound cytotoxicity concentrations (CC) on canine peripheral blood mononuclear cells (PBMC) and DH82 cells was determined. In all experiments, untreated or miltefosine-treated controls were used. (-)- α -bisabolol and miltefosine showed no toxicity to PBMC (CC₅₀ > 1080 μ M). DH82 cells treated with (-)- α -bisabolol showed cytotoxic concentration at $556.5 \pm 1.253 \mu$ M while for miltefosine it was $170.2 \pm 1.268 \mu$ M. (-)- α -bisabolol caused growth inhibition of promastigotes with IC₅₀ $117.5 \pm 1,291 \mu$ M (24 h), $35.73 \pm 1,076 \mu$ M (48 h) and $31.02 \pm 1,161 \mu$ M (72 h). Miltefosine caused growth inhibition of promastigotes with IC₅₀ $4,8 \pm 1,080 \mu$ M (24h), $9,5 \pm 1,198 \mu$ M (48h) and $8,6 \pm 1,253 \mu$ M (72h). Intracellular amastigotes of PBMC showed IC₅₀ of $34.76 \pm 1,265 \mu$ M (24h) in cells treated with (-)- α -bisabolol and the group treated with miltefosine showed IC₅₀ of $30,57 \pm 1,596 \mu$ M. Main ultrastructural alterations observed in promastigote forms with (-)- α -bisabolol were cytoplasmic vacuolization, lipid inclusions, electron-dense membranes dispersed in the cytoplasm, cell disorganization and loss of parasite structural morphology. The present study demonstrated the *in vitro* effectiveness of (-)- α -bisabolol against *L. infantum*, which will be used as a base for later *in vivo* studies.

Key words: visceral leishmaniasis, dog's diseases, canine visceral leishmaniasis, treatment.

ÍNDICE

RESUMO	VII
ABSTRACT	VIII
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Leishmanioses	2
1.2. Leishmaniose Visceral (LV)	4
1.3. Morfologia	5
1.4. Ciclo biológico e transmissão de <i>Leishmania infantum</i>	5
1.5. Leishmaniose visceral canina-LVC	6
1.5.1. Sinais clínicos da LVC	7
1.5.2. Resposta imunológica da LVC	8
1.5.3. Diagnóstico da LVC	10
1.5.4. Medidas de controle da LVC	11
1.5.5. Tratamento da LVC	12
1.6. Óleos essenciais	14
1.7. (-)- α -bisabolol	14
2. OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS	17
2.1. Objetivo Geral	17
2.2. Objetivos específicos:	17
3. MATERIAIS E MÉTODOS	18
3.1. Reagentes	18
3.2. Parasitos	18
3.3. Atividade do (-)- α -bisabolol contra formas promastigotas de <i>L. infantum</i>	18
3.4. Animais e considerações éticas	19
3.5. Obtenção de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) canino	19

3.6.	Células de linhagem DH82	20
3.7.	Ensaio de citotoxicidade	20
3.8.	Atividade do (-)- α -bisabolol contra formas amastigota intracelulares de <i>L. infantum</i>	21
3.9.	Microscopia eletrônica de transmissão	21
3.10.	Análise estatística	22
4.	RESULTADOS	23
4.1.	Atividade do (-)- α -bisabolol e miltefosina contra formas promastigota de <i>L. infantum</i>	23
4.2.	Ensaio de citotoxicidade	24
4.3.	Atividade leishmanicida contra formas amastigota intracelular de <i>Leishmania infantum</i> .	24
4.4.	Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de promastigotas de <i>L. infantum</i>	27
5.	DISCUSSÃO	32
6.	CONCLUSÕES	39
7.	REFERÊNCIAS	40

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1- Distribuição de casos de leishmaniose visceral e tegumentar. (Organização Mundial de Saúde, 2016)	4
Figura 2- Estrutura química de (-)- α -bisabolol	15
Figura 3- Atividade do (-)- α -bisabolol e miltefosina contra formas promastigotas de <i>L. infantum</i> após 24h, 48h e 72h de tratamento.	23
Figura 4- Viabilidade de mononucleares de sangue periférico canino e células DH82 tratadas por 24h com (-)- α -bisabolol e miltefosina.	24
Figura 5- Inibição do crescimento das amastigotas intracelulares de <i>Leishmania infantum</i> em em PBMC tratadas por 24h com (-)- α -bisabolol.	25
Figura 6- Fotomicrografia representativa da atividade leishmanicida de (-)- α -bisabolol contra formas amastigotas de <i>Leishmania infantum</i> em PBMC.	26
Figura 7- Atividade contra amastigota intracelular de <i>L. infantum</i> em PBMC canino tratadas por 24h com (-)- α -bisabolol.	27
Figura 8- Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> não tratadas.	28
Figura 9- Alterações ultraestruturais de formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> tratadas com 67,5 μ M de (-)- α -bisabolol por 24 horas.	29
Figura 10- Alterações ultraestruturais de formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> tratadas com 135 μ M de (-)- α -bisabolol por 24 horas.	30
Figura 11- Alterações ultraestruturais de formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> tratadas com 31,02 μ M de (-)- α -bisabolol por 72h.	31

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Concentração inibitória de (-)- α -bisabolol e miltefosina contra formas promastigota de <i>Leishmania infantum</i>	23
Tabela 2- Concentração citotóxica de (-)- α -bisabolol contra DH82 e células mononucleares de sangue periférico canino após 24h de tratamento	24
Tabela 3- Concentração inibitória contra formas amastigota de <i>Leishmania infantum</i> e índice de seletividade de (-)- α -bisabolol e miltefosina após 24h de tratamento.....	27

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CC ₅₀	Concentração citotóxica 50%
CO ₂	Dióxido de carbono
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
IC ₅₀	Concentração inibitória 50% da população
IFN- γ	Interferon gama
IL	Interleucina
KCl	Cloreto de potássio
KHPO	Fosfato monopotássico
LV	Leishmaniose visceral
LVC	Leishmaniose visceral canina
MAPA	Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento
MS	Ministério da Saúde
NaCl	Cloreto de sódio
NK	Células natural killer
NO	Óxido nítrico
PBMC	Células mononucleares de sangue periférico
PBS	Tampão fosfato salino
PCR	Reação de cadeia de polimerase
PGE ₂	Prostaglandina E ₂
pH	Potencial hidrogeniônico
ROS	Espécie reativa de oxigênio
Sb ^{III}	Antimônio trivalente
Sb ^V	Antimônio pentavalente
TGF- β	Fator de transformação de crescimento beta
TNF- α	Fator de necrose tumoral
iNOS	Óxido nítrico sintase induzida

1. INTRODUÇÃO

O conceito de *One Health*, implementado pela Organização Mundial de Saúde (WHO), tem como principal objetivo promover a integração de grupos multidisciplinares de pesquisa com o intuito de criar melhores estratégias de controle contra as principais zoonoses que provocam alta mortalidade no mundo. Dentro desse grupo de interesse estão as leishmanioses (1).

As leishmanioses representam um conjunto de doenças infecciosas não contagiosas causadas por protozoários do gênero *Leishmania* sp. Esse grupo apresenta doenças de ampla distribuição mundial com características epidemiológicas, biológicas e formas clínicas distintas que dificultam o controle. (2). De acordo com o agente etiológico e manifestações clínicas, podem ser categorizadas em leishmaniose visceral e tegumentar (3,4). A principal forma de transmissão é a vetorial por flebotomíneos fêmeas infectados com formas promastigotas do parasito durante o repasto sanguíneo. Logo após a infecção, ocorre um processo inflamatório composto por células do sistema imunológico que irão internalizar as formas promastigotas metacíclicas, que se diferenciam em formas amastigotas disseminando-se pelo organismo (5).

Para completar o ciclo biológico do parasito é necessário um hospedeiro vertebrado como o homem, felinos ou animais selvagens, contudo os cães são considerados os principais reservatórios de *Leishmania infantum* (6,41). Diante da importante função epidemiológica dos cães para a transmissão, existem diversos grupos de pesquisa que consideram os cães como alvos significativos para estratégias eficazes de controle de leishmaniose canina (7), assim como outras práticas, como o controle vetorial e vacinas preventivas (8).

A leishmaniose visceral canina (LVC) tornou-se uma preocupação em saúde pública devido a contínua expansão e aumento de incidência de casos. Isso se deve a algumas particularidades, como dificuldades de diagnóstico precoce e desenvolvimento de terapias eficazes (9).

No Brasil, foi autorizado o tratamento da LVC pelo Ministério da Saúde (MS) e pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) por meio da assinatura conjunta desses órgãos em Nota técnica 001/2016 autorizando o registro do Milteforan[®] (fórmula desenvolvida para cães), principal fármaco utilizado na Europa, e que não é utilizada para tratamento humano no Brasil. Entretanto, existe uma grande discussão sobre essa medida,

visto que o fármaco é caro, provoca efeitos adversos e toxicidade principalmente a níveis hepáticos e renais (10).

Devido a esses fatores citados e a permanência da problemática, é crescente o interesse de pesquisa para novos alvos terapêuticos que demonstrem ação efetiva contra o parasito e que não gerem prejuízos à saúde animal. Estudos com produtos e extratos de origem natural vêm mostrando que esses podem ser promissores na ação contra *Leishmania* sp (11–15).

O (-)- α - bisabolol é um álcool sesquiterpeno monocíclico presente no óleo essencial de diferentes plantas, como por exemplo, *Matricaria chamomilla*, popularmente conhecida como camomila. A presença de hidrocarbonetos lipofílicos em sua estrutura química promove mudanças na permeabilidade celular facilitando sua penetração e absorção (20). Devido ao seu baixo grau de toxicidade, é utilizado amplamente na indústria de cosméticos (16). Além de seus benefícios dermatológicos, é crescente o estudo de sua ação antitumoral (17), antimicrobiana (18) e moduladora dos processos inflamatórios (19), também são descritos seus efeitos contra agentes infecciosos provocando alterações na integridade celular, principalmente na membrana estrutural de mitocôndrias (11).

A ação antiparasitária do (-)- α -bisabolol foi descrita contra *Leishmania amazonensis* nas formas promastigota e em macrófagos de lavado peritoneal de BALB/c com amastigotas internalizadas (11). Nesse estudo, a concentração inibitória (IC₅₀) de crescimento em promastigotas e em amastigotas intracelulares foi de 36,29 μ M e 19,15 μ M, respectivamente. Além de *L. amazonensis*, o (-)- α -bisabolol também foi testado contra promastigotas de *Leishmania infantum* isolada de cão e demonstrou IC₅₀ de 10,99 μ g/mL (21). Esses estudos mostram que o (-)- α -bisabolol tem um efeito leishmanicida e que esse composto pode ser um bom candidato a ser integrado no painel de drogas para o tratamento de doenças causadas por *Leishmania* sp. Na literatura existem poucos dados sobre a ação do (-)- α -bisabolol em células mononucleares de sangue periférico canino infectadas com *L. infantum* isoladas de cão, como propõe o presente estudo, no qual pretende-se avaliar não somente a atividade do (-)- α -bisabolol em formas promastigotas de *L. infantum*, mas também sobre amastigotas intracelulares em células mononucleares obtidas de sangue periférico canino.

1.1. Leishmanioses

As leishmanioses integram um grupo de doenças causadas por diferentes espécies de protozoários pertencentes à ordem Trypanosomatida, família Trypanosomatidae e gênero

Leishmania (2). Até o momento, são conhecidas mais de 20 espécies patogênicas ao homem e a outros hospedeiros mamíferos (4,22).

O gênero *Leishmania* é composto pelos subgêneros *Leishmania* e *Viannia*. Os critérios de divisão foram baseados na observação de características biológicas de desenvolvimento do parasito no interior do tubo digestivo de flebotomíneos. Os parasitos que se desenvolvem no intestino médio do inseto foram agrupados no subgênero *Leishmania* e, os que estão presentes no intestino posterior, pertencem ao subgênero *Viannia* (23).

Existem três formas de apresentação clínica importantes de leishmanioses: a leishmaniose visceral (LV), também chamada de calazar; leishmaniose cutânea (LC); e a leishmaniose mucocutânea (MCL) (4).

Mundialmente, as leishmanioses são um grave problema em saúde pública devido a sua amplitude e diversidade de características clínicas, biológicas e epidemiológicas. A situação de endemidade da doença se estende por 98 países de clima tropical, subtropical e temperado (24,25); passando por ecossistemas de origem desértica, florestas tropicais, ilhas oceânicas e atingindo ambiência urbana (26).

Em 2015, 197.552 novos casos de leishmaniose cutânea e 22.187 novos casos de leishmaniose visceral foram reportados pela Organização Mundial de Saúde (OMS) (24). O Brasil em conjunto com a Índia e os países do Leste da África reportou em 2016 maior número de casos de leishmaniose visceral e tegumentar (Figura 1).

Nas Américas, o Brasil também apresentou 95,1% dos casos de leishmaniose visceral, porém observou-se uma crescente expansão geográfica na Colômbia, Peru e Paraguai (Figura 1). As regiões de fronteira recebem uma maior atenção devido aos países fronteiriços apresentarem características favoráveis à expansão da transmissão das leishmanioses, compartilhando casos, ambientes, espécies de parasitos, potenciais vetores e reservatórios (24).

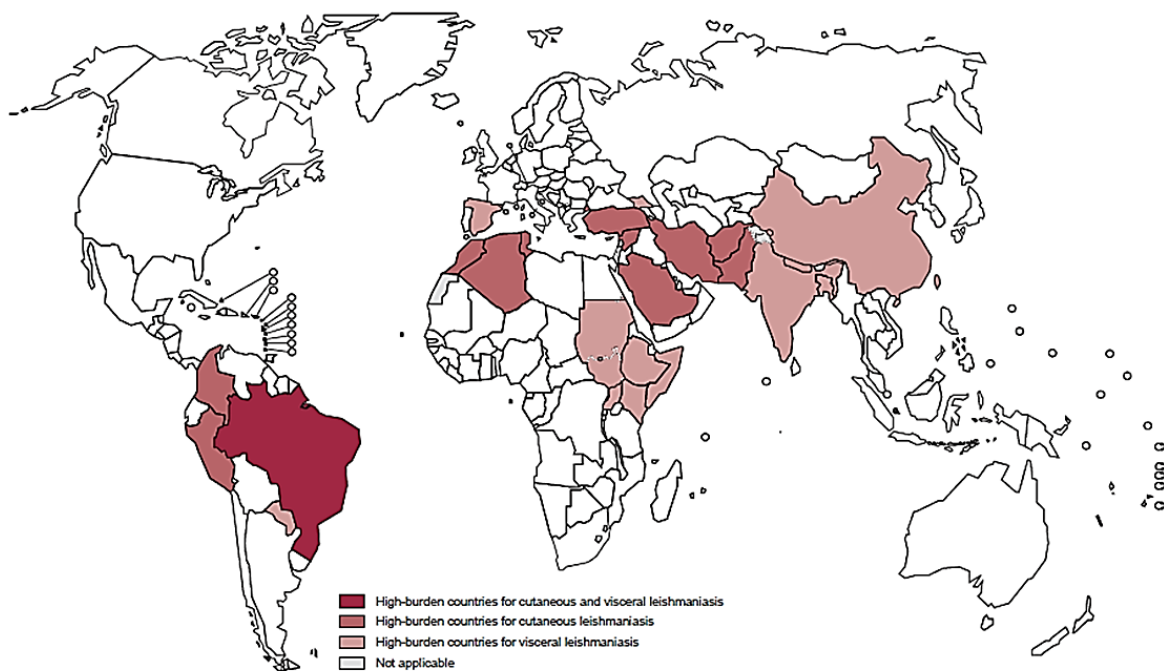


Figura 1- Distribuição de casos de leishmaniose visceral e tegumentar. (Organização Mundial de Saúde, 2016). O Brasil apresentou elevado número de casos de leishmaniose visceral e tegumentar. A Colômbia, Peru, Argélia, Marrocos, Tunísia e países do oeste asiático apresentaram elevado número de casos de leishmaniose tegumentar. A Índia, China e países do leste africano apresentaram elevado número de casos de leishmaniose visceral.

A forma com maior frequência de casos mundialmente é a leishmaniose cutânea, porém a leishmaniose visceral, se não tratada, torna-se a forma clínica mais grave devido a complicações seguidas de óbito. (24)

1.2. Leishmaniose Visceral (LV)

No Brasil, o agente etiológico da LV é *L. infantum* (3). Em países do Velho Mundo, além da transmissão zoonótica ocorre a transmissão antroponótica, cujo agente etiológico é *Leishmania donovani* (3).

Em relação ao vetor, são conhecidas por volta de 30 espécies de flebotomíneos (Diptera: Psychodidae) que transmitem os parasitos do gênero *Leishmania*, causadores da leishmaniose visceral humana e canina nas Américas. A principal espécie de vetor é *Lutzomyia longipalpis*, mas outras espécies, como *Lutzomyia migonei* (27) e *Lutzomyia cruzi* (28), foram relatadas em surtos ocorridos na Argentina e Mato Grosso do Sul, respectivamente. No Velho Mundo, *L. donovani* é transmitida por espécies do gênero *Phlebotomus* (29).

A leishmaniose visceral é uma doença de transmissão vetorial, consequente da infecção das células do sistema fagocítico mononuclear, principalmente da medula óssea, linfonodo, fígado e baço, causando hepatomegalia, esplenomegalia, anorexia, cronicidade de sintomas e morte. Todos os indivíduos estão susceptíveis à doença, sobretudo àqueles que apresentam quadros de imunossupressão e desnutrição (30).

1.3. Morfologia

O parasito apresenta duas formas evolutivas, amastigota e promastigota. A amastigota se desenvolve no interior de células de defesa de hospedeiros vertebrados, apresenta formato ovóide, medindo de 3-5 µm de diâmetro com núcleo central e cinetoplasto contendo DNA extranuclear. Essas formas são adaptadas à temperatura corporal de mamíferos. No tubo digestivo do flebotomíneo fêmea se desenvolve a forma promastigota, em temperatura entre 22 e 26 °C, medindo de 5-15 µm, com forma alongada, móveis e com flagelo na extremidade anterior (5, 18, 20).

1.4. Ciclo biológico e transmissão de *Leishmania infantum*

No ciclo de vida e transmissão de parasitos do gênero *Leishmania* estão integrados mecanismos entre parasito, vetor, hospedeiro vertebrado e ambiente (35).

O flebotomíneo fêmea, durante o repasto sanguíneo em hospedeiro mamífero infectado, ingere amastigotas livres presentes nos tecidos ou em fagolisossomos dos macrófagos ou outras células fagocíticas (36). No intestino anterior do vetor ocorre a diferenciação de amastigota em promastigota procíclicas, as quais se multiplicam por divisão binária. Posteriormente, as formas promastigotas passam por sucessivos estágios (nectomonada, leptomonadas e haptomonadas) até alcançarem a região torácica do intestino do vetor. As formas leptomonadas secretam quitinases e um gel denominado PSG (promastigote secretory gel), que destroem a válvula estomodeal do vetor e dificultam o processo de sucção do sangue. As formas leptomonadas se diferenciam em formas promastigota metacíclica, que é a forma infectante para os mamíferos. Desta forma, em um próximo repasto, o flebotomíneo acaba regurgitando o sangue recém-ingerido, o qual contém as formas promastigotas metacíclicas, ocasionando a transmissão do parasito (32,37,38). No local da picada, formas promastigotas metacíclicas são internalizadas por macrófagos e por outras células fagocíticas. Além da pele, as formas promastigotas metacíclicas podem atingir células de defesa presentes na mucosa ou órgãos como, por exemplo, o fígado, baço e medula óssea (9).

No interior dessas células, o pH do meio ácido, o aumento da temperatura e a disponibilidade de íons de ferro (Fe^+) (39), acarretam a diferenciação das formas promastigotas em amastigotas, as quais se multiplicam por divisão binária. Algumas células, devido à alta densidade parasitária, se rompem e liberam amastigotas que alcançam outras células fagocíticas propagando a infecção (5,31).

No processo de transmissão das leishmanioses existe uma complexidade de interações entre o agente infeccioso, vetor, hospedeiros vertebrados e reservatórios do parasito. Esses incluem mamíferos domésticos e selvagens, os quais podem ser roedores, primatas, marsupiais e carnívoros. Os cães são considerados os principais reservatórios domésticos de *L.infantum* e em áreas endêmicas e atuam como fatores de risco para o desenvolvimento da leishmaniose visceral zoonótica (6,40) contribuindo para a manutenção e ampliação do ciclo urbano, devido a sua proximidade ao humano e coexistência de LV (26).

1.5. Leishmaniose visceral canina-LVC

Existe um número variado de espécies de *Leishmania* sp isoladas de cães ou caracterizadas molecularmente que são causadores de leishmanioses canina. Na América do Sul, estas incluem *Leishmania amazonensis*, *Leishmania brasiliensis*, *Leishmania colombiensis*, *Leishmania mexicana*, *Leishmania panamensis*, *Leishmania peruviana*, *Leishmania pifanoi* e *Leishmania infantum*, agente etiológico da LVC (43).

A LVC é considerada um agravo de importância em saúde pública devido à expansão contínua do número de casos. Esse aumento na distribuição de casos da doença pode estar relacionado a fatores socioeconômicos e climáticos (7). No Brasil, a população de cães estimada em 2013 foi de 52 milhões (44), isso somado à susceptibilidade vetorial e a do animal, potencializa a disseminação da doença (45).. A LVC está presente principalmente na América do Sul e na região do Mediterrâneo. No hemisfério ocidental está em crescente propagação desde o norte da Argentina, passando pela América Central até o norte dos Estados Unidos e para algumas províncias do Canadá. Na Europa é descrita, sobretudo na Espanha e Itália.. É endêmica em algumas regiões da Ásia e África; no entanto, casos foram reportados em países não endêmicos como Reino Unido e Alemanha (7,35).

A dinâmica de transmissão da leishmaniose canina dependerá de alguns fatores como, por exemplo, preferência alimentar do vetor, densidade de vetores, densidade populacional de cães e susceptibilidade dos mesmos, grau de exposição de vetores e práticas de controle realizadas pelos proprietários (35). As principais medidas de controle e vigilância da

transmissão são direcionadas ao vetor (uso de repelentes, coleiras e mosquiteiros) e a eliminação ou tratamento de cães doentes (42).

Cães de diferentes idades, sexo e raças são susceptíveis a infecção por *L. infantum* e de acordo com as respostas inespecíficas entre o parasito e o hospedeiro, o animal poderá controlar a infecção permanecendo assintomático e aparentemente saudável. Por outro lado, há aqueles animais que apresentam um quadro crônico da doença com apresentação de sinais clínicos (46).

1.5.1. Sinais clínicos da LVC

Os cães infectados e sintomáticos apresentam leishmaniose clínica quando há manifestação de sinais clínicos e/ou alterações patológicas. De outro modo, animais ainda que infectados mas que não demonstram manifestações clínicas apresentam infecção subclínica ou são assintomáticos. De acordo com a evolução da doença e agravamento de sinais clínicos, a infecção pode ser letal em um curto período de tempo (7).

Durante a infecção aguda, as principais alterações clínicas no hospedeiro vertebrado são sistêmicas, acometendo principalmente linfonodos, fígado, baço, pele, olho e o trato gastrointestinal (47).

Em achados histopatológicos de fígado de cães naturalmente infectados geralmente observa-se uma reação inflamatória crônica caracterizada por infiltrado de células mononucleares localizado no espaço porta e parênquima hepático. Em cães assintomáticos também tem sido relatado presença de granulomas hepáticos, o que promove uma diminuição de parasitos no fígado desses animais (48).

Em geral no exame físico são observados linfadenopatia local ou generalizada, eczemas, onicogribose, lesões de pele como alopecia multifocal e úlceras cutâneas em orelha, focinho e região periorbital. A presença de lesões cutâneas favorece a transmissão por vetores (49).

Outros sinais clínicos podem ser observados como ceratoconjuntivite seca bilateral, blefarite, glaucoma, uveíte, epistaxe, anemia, insuficiência renal, edema de pata, progressiva perda de peso e apetite, poliúria e polidipsia. Em casos críticos, os animais podem apresentar neuralgia, poliartrite e lesões ósseas osteolíticas e osteoproliferativas além de sinais de musculatura atrofiada (50,51).

Os níveis de gravidade e o quadro clínico variável da LVC são decorrentes de interações complexas entre mecanismos de resposta inter-parasito e imunocompetência do hospedeiro (52).

1.5.2. Resposta imunológica da LVC

A resposta imunológica do hospedeiro é fundamental para a evolução da infecção. A pele é a primeira barreira contra o parasito e exerce função importante na imunopatogênese da doença (53,54). Logo após a inoculação dos parasitos na pele, são ativados fatores do sistema complemento contra as formas promastigotas. Aqueles que sobreviveram rapidamente são internalizados nas células residentes do sistema imunofagocítico: células de Langerhans, células dendríticas, neutrófilos e principalmente macrófagos. Em pouco tempo ocorre recrutamento de macrófagos e outras células como, por exemplo, mastócitos que também exercem função crucial na resposta imune inata e na resistência contra a infecção de *L. infantum* na derme (13).

Proteofosfoglicanos secretados pelo parasito, principalmente *Leishmania mexicana* e *L. infantum*, são fortes estimuladores para o recrutamento de diferentes tipos celulares. No entanto, os macrófagos são apontados como a célula hospedeira mais importante no estabelecimento da infecção e permanência do parasito (39).

O curso da infecção de diferentes espécies de *Leishmania* sp depende sobretudo da modulação da atividade fagocítica de macrófagos, resultante de interações entre distintos receptores, incluindo receptores do sistema complemento (CR), receptores de manose, receptores de fibronectina e receptores Fc γ (38).

Os macrófagos, além de sua atividade fagocítica e microbicida, também atuam como células apresentadoras de antígeno (APCs) que orientam-se até os nódulos linfáticos para ativar linfócitos T *naive*, que por sua vez iniciam um processo de proliferação e diferenciação em linfócitos T efetores (55).

Os linfócitos T são guiados para o sítio de ação por específicos gradientes de quimiocinas. As células Th1, principalmente células NK e linfócitos T ativadas, produzem IFN- γ estimulando a resposta inflamatória e diminuindo o crescimento de amastigotas intracelulares de *Leishmania* sp. As células Th2 atuam na resposta humoral caracterizada pela ação de anticorpos e produção de IL-4, considerada uma via alternativa de ativação de macrófagos. Em animais infectados assintomáticos prevalece a resposta Th1, uma vez que o

IFN- γ e juntamente com diferentes citocinas inibem a ação de células Th2. Em animais susceptíveis com demonstração de sinais clínicos, ocorre um aumento na resposta Th2 e simultaneamente uma baixa na ativação da resposta Th1. Nas lesões cutâneas de animais sintomáticos é descrito presença acentuada de linfócitos B na derme associados a uma manifestação clínica intensa (56).

Além da pele, diferentes órgãos apresentam simultaneamente respostas humoral e celular durante a infecção por *L. infantum* modulados por diversas quimiocinas e citocinas. As principais citocinas descritas são IFN- γ , IL-6, IL-1, IL-12, IL-15, TGF- β , IL-10, TNF- α , e IL-4 e IL-2 (54,57–59). As citocinas IL-10 e IFN- γ são apontadas como determinantes no curso da resposta imunológica da leishmaniose visceral, assim como diferentes mediadores inflamatórios e anti-inflamatórios de origem lipídica como PGE-2, PGF-2 alfa e LTB-4 também estão envolvidos na patogênese da leishmaniose visceral canina (127).

O IFN- γ participa da resposta contra *Leishmania* induzindo a inflamação. A secreção de IL-1 β é descrita durante os processos de autofagia celular de macrófagos ativados ou infectados por *Leishmania* e a IL-6 tem função na indução da produção de neutrófilos na medula óssea, na diferenciação de linfócitos T auxiliares produtores de IL-17 e na proliferação de linfócitos B (39).

A IL-18 estimula a produção de IFN- γ que age em sinergia com a IL-12, induzindo a inflamação e atuam, sobretudo na ativação de linfócitos T e nas células NK. As células NK promovem o aumento da atividade citotóxica e diferenciação de linfócitos Th1. A IL-15 atua como fator de sobrevivência das células NK e de linfócitos T CD8+ de memória (125).

O TGF- β e a IL-10 atuam sobre macrófagos como reguladores de feedback negativo. O TGF- β inibe a proliferação e funções de linfócitos T, de neutrófilos, de células endoteliais e a ativação clássica de macrófagos. A IL-10 pode inibir as células de defesa ao inibir a secreção de citocinas pro-inflamatórias como a IL-4, a expressão de co-estimuladores, e a expressão de moléculas MHC de classe II (39).

Em modelos murinos, como também em estudos com cães infectados com *L. infantum*, tem-se relatado o sinergismo entre IFN- γ e TNF- α na ativação de iNOS (óxido nítrico sintase induzida) e produção de óxido nítrico (NO), principal via de resposta de macrófagos contra amastigotas de *Leishmania* sp (60).

1.5.3. Diagnóstico da LVC

Diferentes métodos de diagnósticos, tratamento e estratégias de controle são aplicados para LVC (5). O diagnóstico clínico da LVC torna-se crítico porque envolve alguns fatores que dificultam a detecção precoce de cães infectados, o qual é essencial para o impedimento da expansão da doença e ponto chave no controle da mesma (61).

Os animais sintomáticos apresentam uma diversidade de sinais e manifestações clínicas, as quais são semelhantes a outros agravos gerando uma infinidade de diagnósticos diferenciais (35). Outro agravante é que a maior parte dos infectados em regiões endêmicas são assintomáticos. Esses fatores favorecem a ocorrência de subdiagnósticos e permanência silenciosa do ciclo de transmissão (62).

Para tal, os métodos parasitológicos e/ou laboratoriais são comumente utilizados para a confirmação de casos por meio da observação por microscopia de amastigotas em análises histopatológicas ou por métodos imuno-histoquímicos. Esses métodos auxiliam na investigação de casos inconclusivos através de marcadores em sítios específicos de identificação de parasitos em amostras de biópsias de pele e fígado, aspirados de linfonodo, medula óssea e baço. O isolamento em meio de cultura é outro método parasitológico sugerido para pesquisa, entretanto, em alguns casos tornam-se desfavoráveis, uma vez que é necessário um longo período para verificação da positividade de uma amostra (61,63).

Na rotina clínica, os métodos sorológicos são empregados para exames de triagem e para inquéritos em saúde pública. São pouco invasivos e baseiam-se no reconhecimento de imunoglobulinas produzidas durante a infecção no animal. No decorrer de décadas foram desenvolvidos vários testes sorológicos. Hoje são recomendadas pelo Ministério da Saúde duas técnicas diagnósticas sorológicas: o teste imunocromatográfico rápido (TR), indicado para triagem de animais sorologicamente negativos, e o ensaio imunoenzimático-EIE ou “enzyme linked immunosorbent assay” (ELISA), utilizado para confirmação de animais sororreagentes. O TR pode ser utilizado à campo e o ELISA é realizado em laboratórios credenciados no programa de controle da leishmaniose visceral canina (49,64).

As técnicas moleculares representam um progresso no diagnóstico canino, como por exemplo, a técnica de reação em cadeia de polimerase- PCR, que se destaca pela alta especificidade e sensibilidade, uma vez que possibilita a identificação de material genético do agente nas amostras de animais apresentando diferentes quadros clínicos, contudo está limitada à pesquisa devido aos elevados custos de execução (65).

Em síntese, o diagnóstico da LVC no Brasil ainda é desafiador. Muitos estudos com novos testes, métodos e antígenos mostram-se propícios, porém se faz necessária a validação dos dados laboratoriais em estudo de campo para contribuírem de forma segura para o controle da doença (66).

1.5.4. Medidas de controle da LVC

No Brasil, o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral é formado por medidas baseadas principalmente em relação a eliminação de cães soropositivos, do vetor, do diagnóstico correto e do tratamento efetivo da doença (35).

A existência real de dados que comprovam que a prática da eutanásia de animais soropositivos diminui a ocorrência de leishmanioses é questionável na literatura, sendo considerada por muitos como uma estratégia de saúde pública não efetiva para o controle de casos em animais e humanos (9,67–70). Estudos em regiões onde houve a eliminação da maioria dos animais soropositivos revelaram que houve uma diminuição temporária de casos de LV, porém, não ocorreu a inibição da transmissão (68).

A princípio, o controle vetorial é considerado uma estratégia mais efetiva, porém, o monitoramento da efetividade está pontuado em dificuldades operacionais e alto valor de inseticidas. Outro fator é a limitação de conhecimento sobre a ecologia e biologia de flebotomíneos em regiões urbanas; além da inexistência de um sistema de vigilância entomológica apto a estimar a dimensão da população de vetores (69).

O uso de colares a base de inseticidas tem-se mostrado eficiente na diminuição do risco de infecção, no entanto se restringe à grupos particulares devido ao custo (71,72).

Embora haja um avanço no desenvolvimento de testes rápidos, nas áreas em que coabitam *Leishmania braziliensis* e *L. infantum*, persiste a problemática desses testes não serem suficientes para o diagnóstico devido ao risco de resultados falso negativo ou falso positivo e faz-se necessário testes adicionais para confirmação do diagnóstico (17).

Em relação à infecção dos vetores, tanto animais doentes com sinais clínicos severos quanto os animais assintomáticos possuem alta capacidade de infectar flebotomíneos. Portanto, as medidas de vigilância e controle devem ser dirigidas a ambos (9).

Para o controle de leishmaniose visceral canina é necessário que haja um maior conhecimento de técnicas que permitam compreender os aspectos relevantes sobre a ecologia

e biologia de vetores, assim como mais informações acerca da função de cada integrante na transmissão do parasito (6,73).

Diante desse quadro preocupante, novas estratégias contra a expansão de leishmaniose visceral tornam-se necessárias em nosso país.

1.5.5. Tratamento da LVC

No Brasil, o tratamento da LVC com Milteforan[®] (fórmula elaborada para cães) foi autorizado pelo Ministério da Saúde (MS) e pelo Ministério da Agricultura Pecuária e Abastecimento (MAPA) em 2017 (10). O tratamento de animais é direcionado à cura clínica, à melhor resposta imunológica contra a infecção, diminuição da carga parasitária e principalmente para restringir a capacidade de transmissão do parasito ao vetor (74). À vista disso, existe uma grande discussão sobre essa medida, visto que o tratamento ainda não foi considerado como uma ação de saúde pública (10).

A miltefosina, princípio ativo do Milteforan[®], é um aquilfosfolipídeo (hexadecilfosfocolina) elaborado inicialmente para terapia neoplásica e o primeiro fármaco com administração oral recomendado principalmente para leishmaniose visceral em crianças. A miltefosina atua na disfunção de sinalização de vias e na síntese de membrana celular (8). O acúmulo intracelular da droga, regulado por transportadores ATPase do tipo P, provoca processos similares ao de apoptose em amastigotas de *Leishmania* sp., como também atua sobre a estimulação de óxido nítrico sintase 2, a qual catalisa a produção de NO contribuindo com a resposta celular contra o parasito (75).

A efetividade do Milteforan[®] foi avaliada em cães naturalmente infectados no Piauí demonstrando melhora clínica em 50% (7/14) dos pacientes que receberam doses de 100 mg/animal e 200 mg/animal por no mínimo 28 e no máximo 45 dias de tratamento. Apesar da melhora clínica, os animais permaneceram com carga parasitária alta após 24 meses de tratamento; por conta disso, os autores não consideraram o uso do fármaco em regiões endêmicas (76). Em um estudo na Europa, os resultados foram similares, com melhora clínica nos animais sintomáticos. No entanto, os autores ressaltam a necessidade de acompanhamento clínico durante o tratamento em razão do efeito hepatotóxico e renal da droga (77).

Existem relatos de fetotoxicidade e efeito teratogênico associados ao uso da miltefosina em pesquisas com modelos murinos (78). O principal efeito adverso descrito foi êmese, tanto em cães quanto em humanos (76,77,79).

Um grande desafio na terapêutica com miltefosina é o surgimento de resistência ao medicamento. Tem-se ocorrido relatos de resistência em humanos no tratamento de leishmaniose visceral e cutânea e falha terapêutica em cães (80,81). Os mecanismos de resistência ainda não estão bem esclarecidos na literatura, embora sugere-se que exista uma diminuição da absorção da droga devido à diferença de permeabilidade plasmática, a qual contribui para o aumento do efluxo da droga realizado por transportadores específicos MDR-1(78).

Os principais fármacos disponíveis para o tratamento canino em alguns países são os mesmos utilizados na medicina humana, são eles, os antimoniais pentavalentes, miltefosina, marbofloxacin, alopurinol e combinações, dos quais os três primeiros são considerados os fármacos de primeira escolha (8,78,82).

O Glucantime[®] ou antimoniato de meglumina, mais precisamente antimoniato de N-metil glucamina, foi desenvolvido na França durante o período da Segunda Guerra Mundial. O Glucantime[®] é considerado um pró-fármaco, pois é reduzido a antimônio trivalente (Sb^{III}) no interior de macrófagos e parasitos, sendo esta a forma ativa da droga e não o antimônio pentavalente (Sb^V) (58).

O Alopurinol é um análogo de hipoxantina que bloqueia a xantina oxidase atuando na inibição do metabolismo de purinas e promove um efeito leishmanioestático. Na Europa, seu uso é bem amplo devido a sua baixa toxicidade, como também é constante seu uso em combinação com outros fármacos (74).

Os fármacos de eleição e de segunda escolha são basicamente fórmulas que foram desenvolvidas para outras enfermidades, as quais os sítios de ação ainda não estão exatamente esclarecidos (83).

De fato, o refinamento de doses e combinação desses com outros compostos têm levado a melhores resultados na intervenção da doença, contudo, as drogas ainda não são ideais devido à dificuldades a serem encaradas, tais como custo alto dos fármacos, elevado risco de toxicidade e efeitos adversos, modo de administração, tempo de tratamento e possível resistência (82,84).

Dessa forma, é crescente o interesse em agentes antileishmaniais de origem natural como uma possibilidade de intervenção eficiente e que não provoque efeitos tóxicos ao organismo (11,12,85,86).

1.6. Óleos essenciais

As plantas são alvos de pesquisa para descoberta de novas drogas em razão da produção de uma diversidade de compostos bioativos ou metabólitos, sendo eles resultantes de processos primários ou secundários de mecanismos de defesa contra predadores, patógenos ou espécies competidoras. Os óleos essenciais são produzidos através da combinação de metabólitos secundários representados por grupos de compostos, principalmente terpenos, fenólicos, alcalóides e peptídeos (87).

Os óleos essenciais possuem uma diversidade de atividades farmacológicas, dentre elas antiparasitária. Por serem lipofílicos, os óleos essenciais atravessam a membrana plasmática modificando a permeabilidade celular, provocando danos irreversíveis ao parasito. Essas alterações a nível de membrana podem estar relacionadas a inibição de vias de produção de ácido graxo e também inibição de glicosilação de proteínas afetando a estabilidade celular dos parasitos (126).

Os terpenos são compostos lipofílicos formados por unidades de isopreno que facilmente penetram na bicamada lipídica de membranas celulares provocando as alterações anteriormente citadas, principalmente, em nível de membrana mitocondrial. Em tripanossomatídeos expostos a ação de terpenos é descrito um aumento de volume mitocondrial e do cineplasto, além de desorganização da cromatina nuclear, as quais acarretam na morte do parasito (21).

1.7. (-)- α -bisabolol

O (-)- α -bisabolol, ((-)-6-metil-2-(4-metil-3-ciclohexen-1-il)5-hepten-2-ol) é um álcool sesquiterpeno monocíclico insaturado (Figura 2); princípio ativo de óleos essenciais de diversas plantas como *Matricaria chamomilla*, *Plinia cerrocampaensis*, *Stachys lavandulifolia*, *Larsepitium zemyi*, *Mutellina purpúrea* (88), e *Vanillosmopsis arborea* (89).

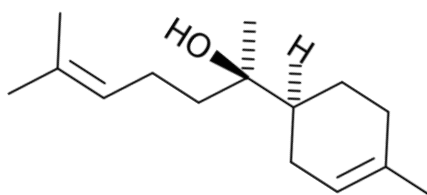


Figura 2-Estrutura química de (-) α -bisabolol.

Na indústria, o (-) α -bisabolol é amplamente utilizado em formulações dermatológicas. Devido à sua propriedade antirritante, sobretudo pela baixa toxicidade é usado em loções calmantes para bebês, shampoos e perfumes, somando mais de 999 usos reportados em 2015 (90).

As múltiplas atividades biológicas e benefícios terapêuticos desse sesquiterpeno são descritos por diferentes grupos de pesquisa. Existem estudos que demonstram a atividade antinoceptiva, antioxidante, microbicida, antineoplásica e antiparasitária (14,18,21,87,89,91,92).

O (-) α -bisabolol tem demonstrado atividade antinociceptiva em mecanismos de modulação da dor mediante o bloqueio de nervos periféricos em formulações tópicas (93,94). Além disso, em virtude da sua característica antioxidante foi investigado seu efeito em patologias renais o qual agiu como nefroprotetor (95) e como gastroprotetor em lesões gástricas induzidas (96).

Dentre outras características, o (-) α -bisabolol exibiu atividade antibacteriana contra espécies patogênicas de *Mycobacterium tuberculosis*, *Salmonella typhimurium* e *Staphylococcus aureus* (97,98). A capacidade de sesquiterpenos induzirem apoptose celular é reportada como um dos principais mecanismos de ação contra agentes microbianos e efeito antineoplásico (17,87).

Além de acarretar morte celular em neoplasias malignas, o (-) α -bisabolol interage com receptores associados com mobilidade tumoral e invasividade, diminuindo o risco de metástases (99).

Estudos com o (-) α -bisabolol demonstraram que é possível em um mesmo alvo ocorrer a combinação entre a sua propriedade antineoplásica com a ativação de fatores anti-

inflamatórios, como TNF- α e isso contribui com a atenuação da atividade de componentes antiapoptóticos (100).

Em pesquisas recentes do nosso grupo, o (-)- α -bisabolol foi efetivo contra agentes de leishmaniose tegumentar, com redução do número amastigotas intracelulares, com IC₅₀ de 36,29 μ M (11,89). Por meio de análise por microscopia eletrônica de transmissão, foram observados diferentes níveis de dano celular em promastigotas e amastigotas de acordo com o tempo de exposição ao produto (11).

Diante disso, o presente estudo tem o objetivo de avaliar a ação leishmanicida de (-)- α -bisabolol em modelo *in vitro* utilizando células mononucleares de sangue periférico de cães. O estudo poderá contribuir com novas perspectivas para o aperfeiçoamento de terapias para a LVC baseadas em compostos de plantas, promovendo uma nova conduta clínica para os animais sororreagentes e diminuição da transmissão da doença em humanos.

2. OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar a atividade leishmanicida do (-)- α -bisabolol sobre formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. infantum* em células mononucleares obtidas de sangue periférico de cães.

2.2. Objetivos específicos:

– Avaliar a atividade leishmanicida do (-)- α -bisabolol contra formas promastigotas de *L. infantum*;

– Avaliar a citotoxicidade do (-)- α -bisabolol em células mononucleares obtidas de sangue periférico de cães e em macrófagos caninos de linhagem DH82;

– Avaliar a atividade leishmanicida do (-)- α -bisabolol contra formas amastigotas intracelulares de *L. infantum* em células mononucleares obtidas de sangue periférico de cães;

– Avaliar as alterações ultraestruturais de formas promastigota de *L. infantum* tratadas com (-)- α -bisabolol.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Reagentes

O meio Roswell Park Memorial Institute (RPMI 1640) foi adquirido do Gibco (USA). O soro fetal bovino foi obtido da Cultilab (BR) e o Giemsa foi adquirido da Merck (USA). Os meios Schneider (Schneider's Insect Medium) e Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM) assim como os antibióticos penicilina e estreptomicina, o Histopaque 1077, o DMSO, o MTT (3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenyltetrazolium Bromide), a miltefosina e o (-)- α -bisabolol foram adquiridos da Sigma Aldrich (USA).

3.2. Parasitos

Foram utilizadas formas promastigota de *L. infantum* (MCAN/BR/2014/21BAÇO) isoladas de um cão naturalmente infectado do município de São Luís-Maranhão. Os parasitos foram previamente caracterizados pelo Laboratório de Referência Nacional para tipagem de *Leishmania* (CLIOC) do Instituto Oswaldo Cruz e criopreservados no Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia. As formas promastigota foram mantidas a 26°C em meio ágar-sangue (20% de sangue desfibrinado de coelho) de Neal-Novy modificado por Nicolle (1908) (NNN) acrescido de meio líquido Schneider's Insect Medium suplementado com 20% de soro fetal bovino, 100 μ g/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina. Nos experimentos foram utilizadas culturas até a 10ª passagem, com parasitos em diferentes fases de crescimento de acordo com cada ensaio.

3.3. Atividade do (-)- α -bisabolol contra formas promastigotas de *L. infantum*

Formas promastigota de 3º ao 4º dia de crescimento, na concentração de 10⁶ parasitos/mL, foram colocados em uma placa de 96 poços contendo diferentes concentrações (16,8 a 540 μ M) de (-)- α -bisabolol (forma líquida e pureza superior ou igual a 95%-cromatografia de gases) no volume final de 200 μ L/poço. As concentrações de teste do (-)- α -bisabolol foram feitas a partir de uma diluição em DMSO, 200x a concentração de uso (concentração estoque - 108 mM), em Schneider's Insect Medium. Foram mantidos poços somente com promastigotas com 0,5% de DMSO. Utilizou-se a miltefosina (1,25-40 μ M) como droga de referência. Em seguida, os parasitos foram incubados a 26°C e após 24, 48 e 72 horas foram realizadas as contagens de formas promastigotas na câmara de Neubauer para determinar a concentração de inibição do crescimento de 50% (IC₅₀) dos parasitos frente ao

(-)- α -bisabolol e a miltefosina a partir dos resultados expressos em porcentagem de parasitos viáveis (PV) de cada concentração. Sendo:

$$PV = Ct/XCc * 100$$

Ct: média da contagem de parasitos tratados. XCc: média da contagem do grupo que não recebeu tratamento.

Foram realizados ao menos três experimentos independentes em no mínimo quadruplicata.

3.4. Animais e considerações éticas

As amostras utilizadas no protocolo para obtenção de células mononucleares de sangue periférico canino foram oriundas de doação de sobras de bolsas de sangue de cães saudáveis, destinadas ao tratamento de pacientes renais. De acordo com a Resolução Normativa nº 30, item 6.1.10, do CONCEA (Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal), não se aplica o parecer da Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) para materiais não oriundos de uma atividade de ensino ou de pesquisa científica.

3.5. Obtenção de células mononucleares de sangue periférico (PBMC) canino

As células mononucleares de sangue periférico foram obtidas por meio da técnica de separação por gradiente de concentração com Histopaque 1077 de acordo com as recomendações do fabricante, com adaptações (101). A bolsa de sangue foi mantida em temperatura ambiente e o volume total foi aliqotado e diluído quatro vezes em meio RPMI 1640 suplementado com 100 μ g/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina em tubos falcon de 50 mL. Em seguida, foi transferido com cuidado um volume de Histopaque 1077 igual ao volume de sangue aliqotado. Os tubos foram centrifugados a 400 g, por 20 min a 20°C em centrífuga Hettich Universal 320R com aceleração 9, sem freio. Após a centrifugação, descartou-se o sobrenadante e o anel de células mononucleares foi transferido para novo tubo falcon de 50 mL, onde foram lavadas com 40 mL de meio RPMI 1640, com posterior centrifugação a 250g, por 10 min a 4°C. Para auxiliar na lise de eritrócitos foi adicionado 1 mL de tampão ACK pH 7,2 (cloreto de amônio- 2,0625g; bicarbonato de potássio- 0,5g; Triplex III a EDTA-0,018g) em temperatura ambiente e após 5 minutos repetiu-se uma nova lavagem em meio RPMI 1640 e centrifugação conforme descrição anterior. As células foram ressuspendidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de

soro fetal bovino, 100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina e 30% de sobrenadante de cultura de células L929, e distribuídas em placas de 96 ou 24 poços, de acordo com cada ensaio, e foram mantidas em estufa com 5% de CO₂, a 37 °C. O meio de cultura foi substituído a cada 48 horas e após 7 dias as células foram submetidas aos ensaios de citotoxicidade e de infecção com *L. Infantum*.

3.6. Células de linhagem DH82

As células DH82 (ATCC[®] CRL-10389TM) são originadas de histiocitose maligna de golden retriever, macho com idade de 10 anos. As células foram cedidas gentilmente pelo Dr. Carlos Luiz Massard do Laboratório de Doenças Parasitárias da Universidade Rural do Rio de Janeiro e foram cultivadas em meio DMEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 µg/mL de estreptomicina e 100 U/mL de penicilina e mantidas a 37°C em 5% de CO₂.

3.7. Ensaio de citotoxicidade

As PBMC (5x10⁵ células/mL) foram colocadas em placas de 96 poços contendo meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 µg/mL de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina, 5% de sobrenadante de cultura de células L929 e mantidas em 5% de CO₂ a 37°C. Após esse período retirou-se o meio e as células foram tratadas com diferentes concentrações de (-)-α-bisabolol (33,75-1080 µM) diluídas em meio com volume final de 100µL/poço. Foram incluídos poços com miltefosina (2,5-80 µM) e controle sem nenhum tratamento. Após 24h de tratamento foram adicionados em cada poço 10 µL de brometo de 3-(4,5-dimetil-2-tiazolil)-2,5-difeniltetrazólio (MTT) a 5 mg/mL. Em seguida, as placas foram incubadas por 5 horas. Após a observação de formação de cristais de formazan, as placas foram centrifugadas por 10 min a 400g. Em seguida, o sobrenadante foi desprezado e acrescentou-se 100µL de dimetilsulfóxido (DMSO). As placas foram agitadas por 10 minutos em agitador de placas e a absorbância obtida em espectrofotômetro a 540 nm. Os valores de absorbância foram normalizados de acordo com a fórmula abaixo:

$$\% \text{ células viáveis} = \frac{\text{Abs amostra} - \text{Abs branco}}{\text{Abs controle} - \text{Abs branco}} * 100$$

O mesmo protocolo foi realizado para avaliar a citotoxicidade do (-)-α-bisabolol nas células DH82 utilizando a miltefosina como droga de referência. A concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀) foi determinada por análise de regressão não linear utilizando o programa estatístico GraphPad Prism 6.0. Foram realizados ao menos dois experimentos independentes em octuplicata.

3.8. Atividade do (-)- α -bisabolol contra formas amastigota intracelulares de *L. infantum*

As PBMC canino (5×10^6 /mL) foram cultivadas em placas de 24 poços, 1 mL por poço, contendo lamínula (0,13-0,16mm-Knittel Glass) e mantidas em meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro fetal bovino, 100 μ g/mL de estreptomicina, 100 U/mL de penicilina e 5% de sobrenadante de cultura de células L929 e mantidas em 5% de CO₂ a 37°C. As células foram infectadas com formas promastigotas de *L. infantum* (5×10^7 parasitos/mL), na proporção de 10:1 (10 parasitos/ macrófago). Após 24 horas de infecção, cada poço foi lavado com solução salina pH 7,2 (NaCl 8,0 g, KCl 0,2 g, KHPO 0,91 g, água tridestilada q.s.p 1000 mL) para remoção de parasitos não internalizados e em seguida fez-se o tratamento com diferentes concentrações de (-)- α -bisabolol (16,8 a 270 μ M) em triplicata por 24h. Após esse período, o meio foi retirado e as lâminas foram fixadas em Bouin (75 mL solução aquosa saturada de ácido pícrico,, 25 mL formaldeído e 5 mL ácido acético), coradas com Giemsa e encaminhadas para leitura em microscópio de luz (Axioplan 2/Zeiss). Foram incluídos poços tratados com miltefosina (5 a 40 μ M) e poços com células infectadas e não tratadas. A contagem de amastigotas intracelulares de 100 células foi utilizada para determinar a concentração inibitória (IC₅₀) por meio do programa GraphPad Prism 6.0. Foram realizados ao menos dois experimentos independentes em triplicata. A média de amastigotas por célula foi obtida do número de amastigota intracelular em 100 células divididas pelo número de células infectadas. O índice de seletividade (IS) foi calculado a partir da relação entre CC₅₀ em PBMC e IC₅₀ de amastigota intracelular.

3.9. Microscopia eletrônica de transmissão

Formas promastigota de *L. infantum* foram tratadas com diferentes concentrações (33,75 a 270 μ M) de (-)- α -bisabolol por 24 horas e 72 horas. Após esse período, os parasitos foram fixados com glutaraldeído 2,5% (Sigma, USA) em solução tampão cacodilato 0,1M, pH 7,2; overnight. Em seguida, foram lavados três vezes com solução tampão cacodilato 0,1M e pós-fixados com tetróxido de ósmio 1%, ferricianeto de potássio 0,8% e cloreto de cálcio 5 mM em tampão cacodilato 0,1M por 30 minutos. Os parasitos pós-fixados foram desidratados em acetona e emblocados em EMBed-812. Cortes ultrafinos foram contrastados com acetato de uranila e citrato de chumbo e examinados em microscópio de transmissão eletrônica JEM-1011 (JEOL, Japan).

3.10. Análise estatística

Os valores de IC₅₀ e CC₅₀ foram calculados por meio de curva de regressão não linear obtida a partir do log da concentração de tratamento pela resposta normalizada, referente ao percentual de parasitos viáveis. Diferenças entre grupos foram analisadas com o teste não-paramétrico de Kruskal-Wallis seguido pelo teste de comparação múltipla de Dunn, $p < 0,05$. Todos os resultados foram analisados estatisticamente com o programa GraphPad Prism 6.0.

4. RESULTADOS

4.1. Atividade do (-)- α -bisabolol e miltefosina contra formas promastigota de *L. infantum*

Foi observado que a eficácia do composto frente às formas promastigotas de *L. infantum* foi tempo e concentração dependentes. A concentração de inibição de crescimento de promastigotas diminuiu aproximadamente de 3 a 4 vezes após 48 horas de tratamento quando comparados com o IC₅₀ de 24h (Tabela 1). O (-)- α -bisabolol na concentração de 570 μ M inibiu o crescimento do parasito em 100% (Figura 2). Em relação à atividade da miltefosina, observou-se maior efetividade em 24h de tratamento, com sua eficácia diminuída quase pela metade quando comparado aos tempos de 48 e 72 horas (Tabela 1). Na concentração de 40 μ M de miltefosina não foi observado parasito viável (Figura 3).

Tabela 1- **Concentração inibitória de (-)- α -bisabolol e miltefosina contra formas promastigota de *Leishmania infantum***

Compostos	IC ₅₀ (μ M)		
	24h	48h	72h
(-)- α -bisabolol	117,5 \pm 1,291	35,73 \pm 1,076	31,02 \pm 1,161
miltefosina	4,8 \pm 1,080	9,5 \pm 1,198	8,6 \pm 1,253

IC₅₀: concentração inibitória para 50% de parasitos. Os dados representam média \pm desvio padrão representativo de ao menos três experimentos independentes realizado em no mínimo quadruplicata.

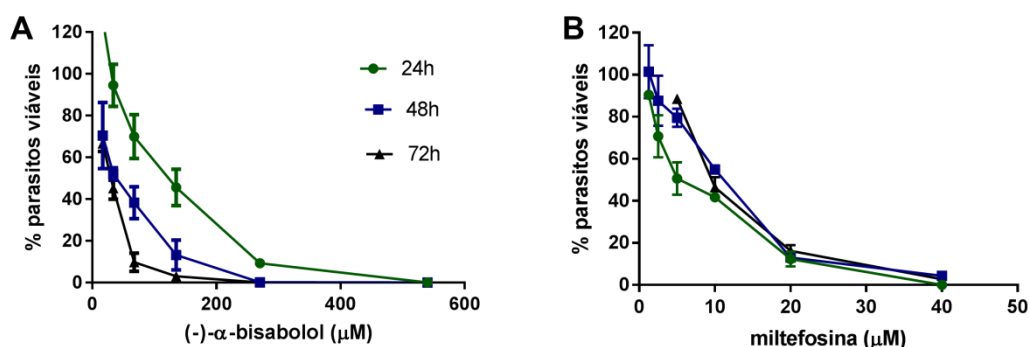


Figura 3- Atividade do (-)- α -bisabolol (A) e miltefosina (B) contra formas promastigotas de *L. infantum* após 24h, 48h e 72h de tratamento.

4.2. Ensaio de citotoxicidade

Foi observado que o (-)- α -bisabolol e a miltefosina não apresentaram toxicidade nas concentrações analisadas para células mononucleares de sangue periférico canino (Figura 4). As células DH82 após o tratamento com (-)- α -bisabolol apresentaram CC_{50} 3 vezes superior ao da miltefosina (Tabela 2).

Tabela 2- **Concentração citotóxica de (-)- α -bisabolol contra DH82 e células mononucleares de sangue periférico canino após 24h de tratamento**

Compostos	CC_{50} (μ M)	
	DH82	PBMC
(-)- α -bisabolol	556,5 \pm 1,253	>1080
miltefosina	170,2 \pm 1,268	>1080

PBMC: células mononucleares de sangue periférico; CC_{50} : concentração citotóxica para 50% de células. Os dados representam média \pm desvio padrão representativo de ao menos dois experimentos independentes realizado em octuplicata.

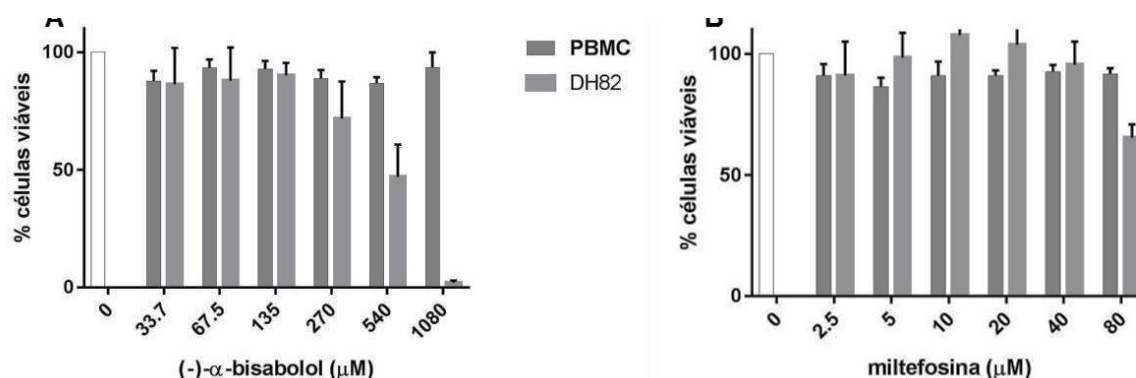


Figura 4- Viabilidade de mononucleares de sangue periférico canino e de células DH82 tratadas por 24h com (-)- α -bisabolol (A) e miltefosina (B).

4.3. Atividade leishmanicida contra formas amastigota intracelular de *Leishmania infantum*.

A análise dos parâmetros de infecção após 24 horas de tratamento com (-)- α -bisabolol demonstrou que as concentrações a partir de 67,5 μ M diminuíram estatisticamente o número de amastigotas intracelulares (Figura 5A) e o percentual de células infectadas (Figura 5B), enquanto a média de amastigotas foi diminuída a partir de 135 μ M (Figura 5C). A diminuição de amastigotas intracelulares em PBMC canino causada pelo tratamento com o (-)- α -bisabolol pode ser observada nas figuras de 5 a 7.

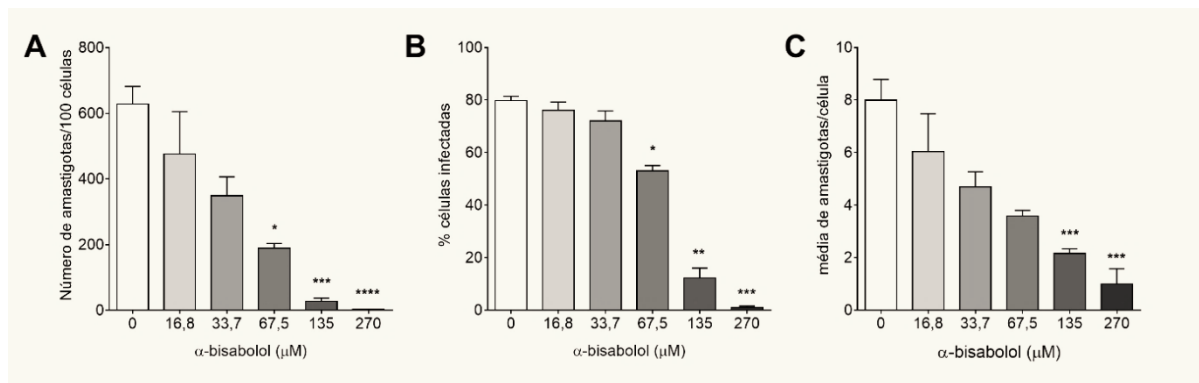


Figura 5- Inibição do crescimento das amastigotas intracelulares em PBMC canino tratadas com (-)- α -bisabolol por 24h. (A) Cada barra representa o número de amastigotas intracelulares em 100 células tratadas com diferentes concentrações de (-)- α -bisabolol. Na concentração de 270 μ M não foi observado amastigota intracelular. (B) Representação da porcentagem de PBMC infectadas por formas amastigotas de *L. infantum* e tratadas com (-)- α -bisabolol. (C) Cada barra representa a média de amastigota intracelular por célula infectada. Os dados representam média \pm desvio padrão de experimento realizado em triplicata; * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, **** $p < 0.0001$

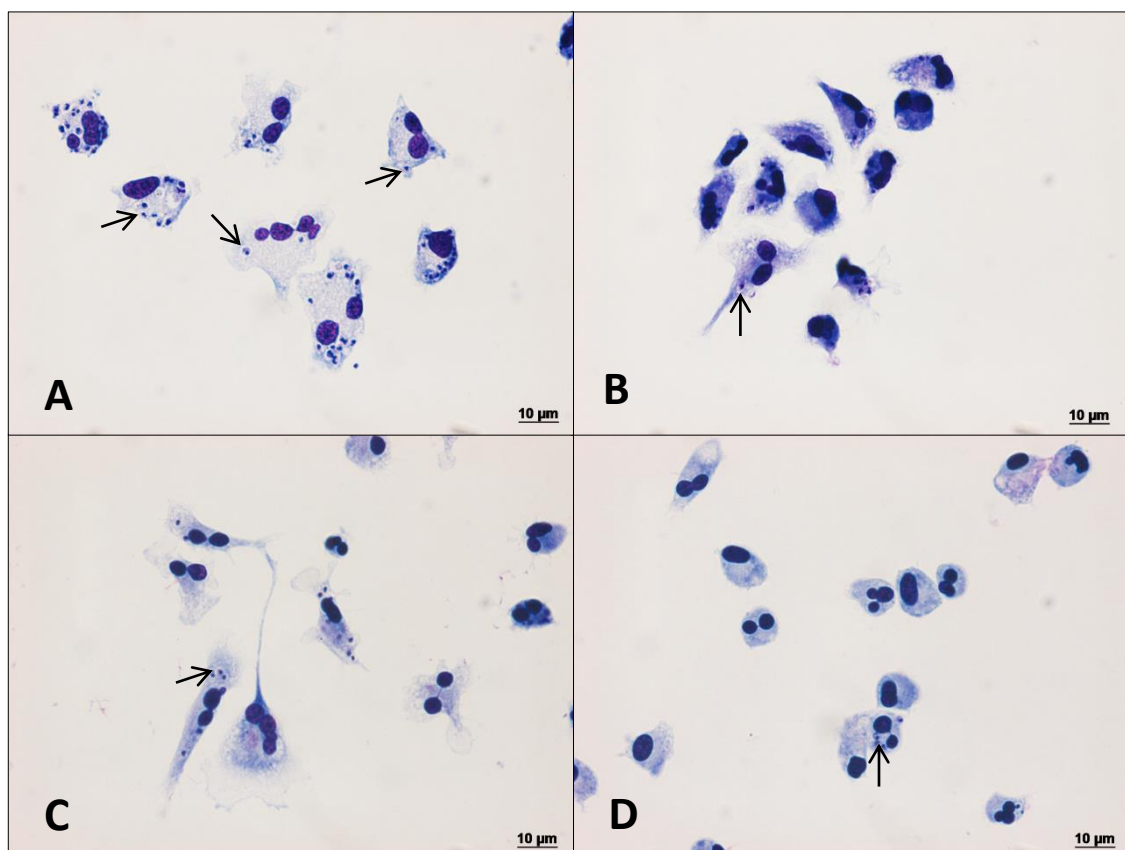


Figura 6- Fotomicrografia representativa da atividade leishmanicida de (-)- α -bisabolol contra formas amastigotas de *Leishmania infantum* em PBMC. (A) PBMC infectadas com *Leishmania infantum*, nota-se a presença de múltiplas amastigotas internalizadas (setas); (B) Células infectadas e tratadas com IC₅₀, mostrando diminuição do índice de infecção; (C) Células infectadas e tratadas por 24h com 67,5 μ M; (D) Células infectadas e tratadas por 24h com 135 μ M; observa-se a presença de poucas células infectadas. Coloração de Giemsa.

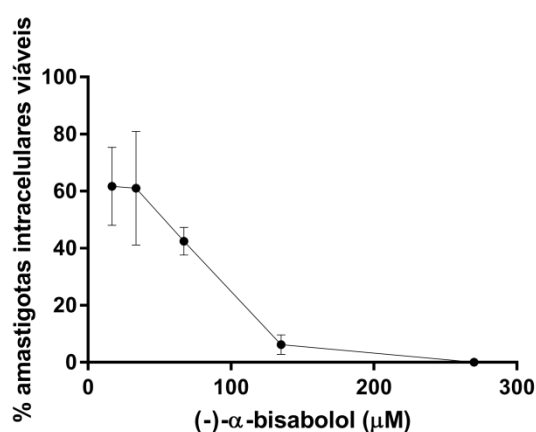


Figura 7- Atividade contra amastigota intracelular de *L. infantum* em PBMC canino tratadas por 24h com (-)- α -bisabolol

Foi observado que a concentração de inibição do crescimento das formas amastigotas intracelulares em PBMC após 24h de tratamento com (-)- α -bisabolol foi semelhante ao da miltefosina. No entanto, o composto natural demonstrou ser mais seletivo ao parasito devido ao maior índice de seletividade em relação ao PBMC canino (Tabela 3).

Tabela 3- Concentração inibitória contra formas amastigota de *Leishmania infantum* e índice de seletividade de (-)- α -bisabolol e miltefosina após 24h de tratamento

Compostos	IC ₅₀ (μ M)	IS
(-)- α -bisabolol	34,76 \pm 1,265	>31,07
miltefosina	30,57 \pm 1,596	>35,32

IC₅₀: Concentração inibitória para 50% de parasitos. IS: índice de seletividade calculado a partir da relação entre CC₅₀ para células de PBMC e o IC₅₀ para amastigota intracelular. Os dados representam média \pm desvio padrão representativo de ao menos dois experimentos independentes realizado em octuplicata.

4.4. Microscopia eletrônica de transmissão (MET) de promastigotas de *L. infantum*

A análise por MET de promastigotas de *L. infantum* tratadas com (-)- α -bisabolol apresentou alterações ultraestruturais que aumentaram de acordo com a concentração e o tempo de tratamento (Figuras 9 a 11), similar ao que foi observado anteriormente no ensaio contra formas promastigota. A avaliação dos parasitos, após 24h de tratamento com 67,5 μ M e 135 μ M de (-)- α -bisabolol a 26°C mostrou a presença de corpúsculos elétron-densos característicos de inclusões lipídicas e inúmeros corpos vesiculares elétron-densos, com material granular em seu interior, dispersos pelo citoplasma. Além disso, foram observadas alterações estruturais, tais como presença de vacúolos atípicos e membranas elétron-densas no citoplasma, como também em suas delimitações observou-se formação de projeções oriundas de inclusões de membrana citoplasmática (Figura 9 e 10). Após 72 horas de tratamento foram observadas mudanças similares, porém mais acentuadas e com danos celulares maiores como descontinuidade de membrana nuclear e mitocondrial, aumento do cinetoplasto, desorganização celular e perda da morfologia estrutural do parasito (Figura 11). Os parasitos que não foram tratados com (-)- α -bisabolol apresentaram morfologia e estruturas celulares preservados (Figura 8).



Figura 8- Microscopia eletrônica de transmissão de promastigotas de *Leishmania infantum* não tratadas. Observam-se estruturas do núcleo (n) e cinetoplasto (k) preservados.

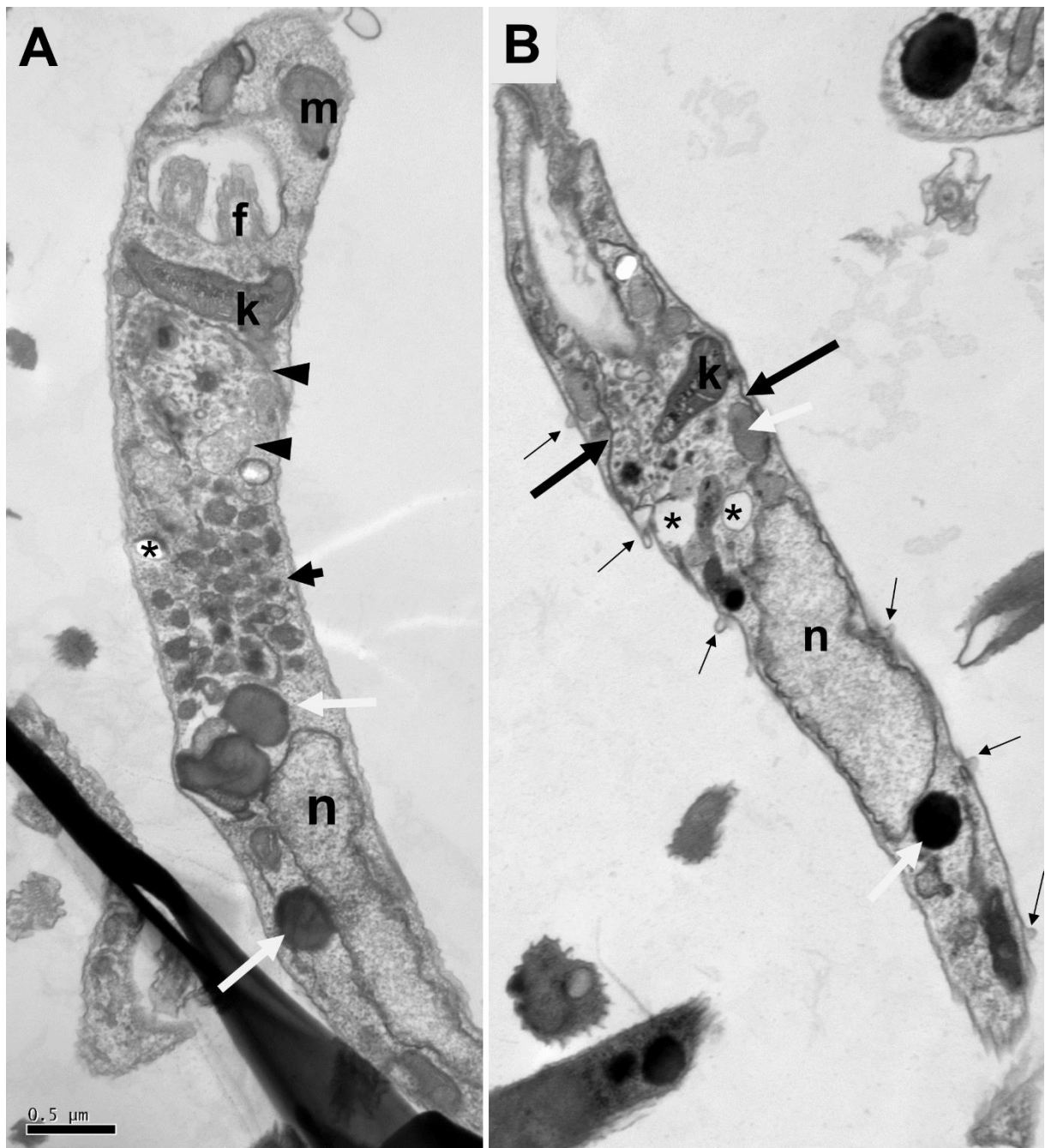


Figura 9- Alterações ultraestruturais de formas promastigotas de *Leishmania infantum* tratadas com 67,5 μM de (-)- α -bisabolol por 24 horas a 26 $^{\circ}\text{C}$. (A) Vesículas elétron-densas características de inclusões lipídicas (setas brancas), corpos vesiculares elétron-densos (seta) e com material granular (cabeça de seta) dispersos no citoplasma. (B) Vacúolos (asteriscos), vesículas elétron-densas características de inclusões lipídicas (setas brancas), e membrana elétron-densa dispersas no citoplasma (setas); e formação de projeções de membrana citoplasmática (setas finas). k: cinetoplasto, m: mitocôndria, n: núcleo, f: flagelo.

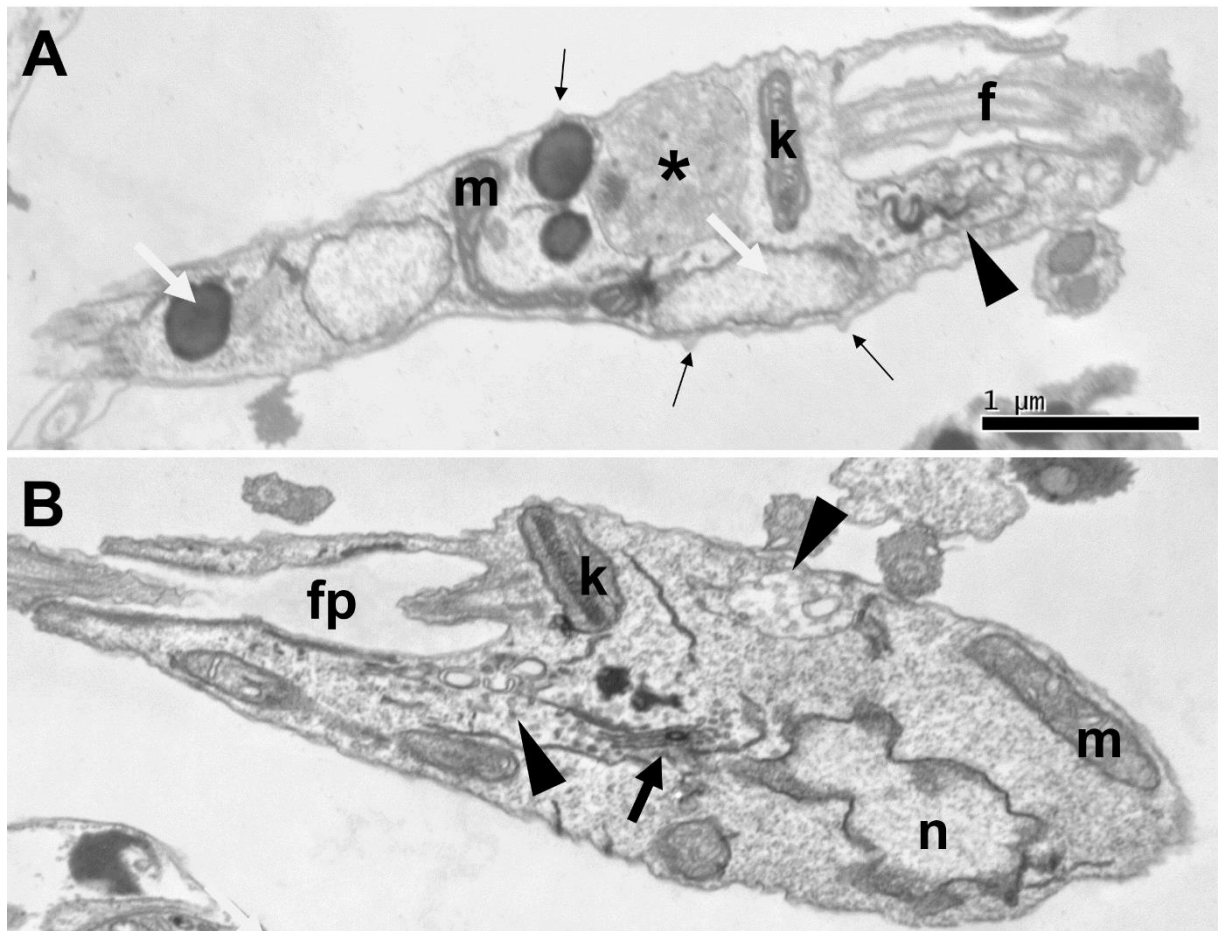


Figura 10- Alterações ultraestruturais de formas promastigotas de *Leishmania infantum* tratadas com 135 μM de (-)- α -bisabolol por 24 horas. (A) Vesículas elétron-densas características de inclusões lipídicas (setas brancas), material vesicular e membranas elétron-densas próximo a bolsa flagelar (cabeça de seta), estrutura vesicular (asterisco) dispersa no citoplasma; e projeções citoplasmáticas (setas finas). (B) Membranas elétron-densas (seta) e vesículas com material granular (cabeça de seta) no citoplasma. k: cinetoplasto, m: mitocôndria, n: núcleo, f: flagelo; fp: bolsa flagelar.

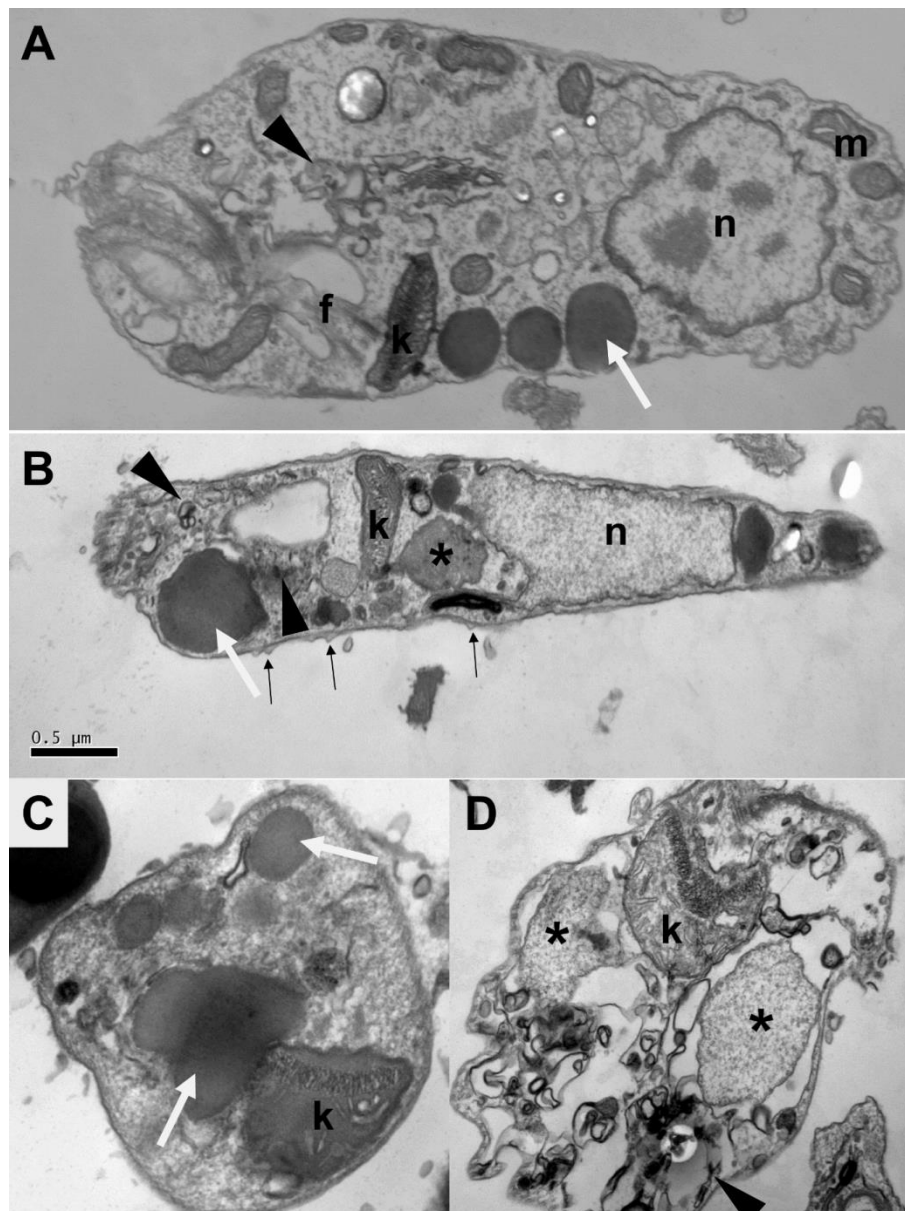


Figura 11- Alterações ultraestruturais de formas promastigotas de *Leishmania infantum* tratadas com 31.02 μM de (-)- α -bisabolol por 72h . (A) Vesículas elétron-densas características de inclusões lipídicas (setas brancas), material vesicular e membranas elétron-densas no citoplasma. (B) Corpúsculos lipídicos (setas brancas), estrutura vesicular (asterisco), membranas e material vesicular elétron-denso (cabeça de seta) no citoplasma; e projeções citoplasmáticas (setas finas). (C) Corpúsculos lipídicos (setas brancas) no citoplasma. (D) Estruturas vesiculares (asteriscos) e membranas elétron-densas dispersas no citoplasma (cabeça de seta) com perda de material citoplasmático. k: cinetoplasto, m: mitocôndria, n: núcleo, f: flagelo.

5. DISCUSSÃO

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o Brasil está presente no grupo de países com maior número de casos de LV notificados em 2015 (4), e a leishmaniose canina, causada por *L. infantum*, está entre as mais importantes doenças parasitárias de cães, transmitidas por vetores (6). No presente trabalho, estudamos o efeito inibitório do (-) α -bisabolol, um álcool sesquiterpeno encontrado em vários óleos de diferentes espécies de plantas, contra as formas promastigotas e amastigotas intracelulares de *L. infantum*, comparando este efeito ao obtido com o uso da droga de referência miltefosina, no intuito de avaliarmos um novo alvo terapêutico que tenha uma ação efetiva contra o parasito, sem causar danos ao animal.

A avaliação leishmanicida *in vitro* com promastigotas é comumente utilizada para triagem de possíveis candidatos para o tratamento de leishmanioses, sendo complementares aos ensaios em amastigota intracelular. Além de verificar a ação de produtos de interesse na forma presente no vetor; este ensaio apresenta vantagens laborais pois, geralmente, a cultura de parasitos é de fácil manutenção em laboratório (87).

Ensaio anteriores do nosso grupo mostraram a ação do (-)- α -bisabolol frente a formas promastigotas de *L. amazonensis*, com IC₅₀ de 8,07 μ g/mL (36,29 μ M) após 24h de tratamento e 4,06 μ g/mL (18,66 μ M) após 48h (11). O efeito do composto foi dependente da concentração e do tempo de tratamento. Os resultados obtidos no presente trabalho foram semelhantes aos obtidos pelo grupo, contudo, houve uma ação tempo-dependente maior para *L. infantum* em relação a *L. amazonensis*, embora o valor de IC₅₀ para *L. amazonensis* seja inferior ao de *L. infantum* em ambos os tempos.

Estudos anteriores demonstraram a efetividade do (-)- α -bisabolol sobre formas promastigotas de *L. infantum* com um IC₅₀ de 49 μ M (21) e comparando esses resultados com os obtidos no presente trabalho, podemos concluir que a atividade antileishmania foi mais eficiente para *L. amazonensis* do que para *L. infantum*. Entretanto, nossos dados mostraram que o (-)- α -bisabolol possui atividade leishmanicida para diferentes espécies de *Leishmania*. A variação de concentrações de inibição de crescimento entre as espécies de *Leishmania* pode estar relacionada às distintas características biológicas específicas de cada espécie gerando diferentes respostas quando em contato com o (-)- α -bisabolol (102).

Estudos com *L. amazonensis* tratadas com miltefosina por 24h encontraram IC₅₀ de 12 \pm 5 μ M (103). Nossos dados utilizando a miltefosina, como droga de referência, e contagem

direta do parasito, como método de verificação da viabilidade parasitária, mostraram resultados semelhantes (IC₅₀ de 4,8 µM).

Enquanto a miltesina teve uma diminuição de atividade em relação ao tempo, o (-)-α-bisabolol apresentou aumento de atividade tempo-dependente, isto é, a miltefosina demonstrou maior efetividade comparada ao (-)-α-bisabolol após 24h de tratamento, porém, após 48 e 72h o (-)-α-bisabolol continuou efetivo contra o parasito enquanto que observou-se uma queda do efeito da miltefosina. Sendo assim, podemos propor que uso da miltefosina em associação com o (-)-α-bisabolol poderia ser vantajoso, pois seria possível utilizar uma terapia associada da miltefosina com o (-)-α-bisabolol em intervalos maiores entre cada administração, ao invés da utilização da miltefosina em doses diárias, o que facilitaria a aceitação do tratamento pelos proprietários. Contudo, ainda são necessários mais estudos antes da utilização desta proposta de tratamento.

Em estudos que avaliaram a concentração inibitória de crescimento de amastigotas em fibroblasto murino L929 infectados com *L. infantum* e tratados com (-)-α-bisabolol, mostraram um IC₅₀-56,9 µM (104), enquanto que, em outro estudo utilizando macrófagos peritoneais murinos infectados com de *L. amazonensis* e tratados com (-)-α-bisabolol, observaram a concentração inibitória de crescimento de amastigotas com IC₅₀ 48 µM (89). Nossos resultados com PBMC de cão mostraram um IC₅₀ de 34,76 µM de amastigota intracelular de *L. infantum* tratados com (-)-α-bisabolol, mostrando que no nosso modelo houve uma inibição do crescimento das amastigotas intracelulares com maior eficiência quando comparados com os dados descritos na literatura.

No presente estudo o antileishmanial de referência, miltefosina, demonstrou atividade contra amastigota intracelular (IC₅₀ 30,57 µM-24h) diferente dos resultados observados no primeiro estudo in vitro descrito na literatura com miltefosina em macrófagos peritoneais de ratos CDI, infectados com *L. donovani*, cujo IC₅₀ foi de 3,9 µM (105). Em estudo posterior, seis espécies de *Leishmania* foram expostas a atividade da miltefosina também em macrófagos peritoneais de ratos CDI e após 72h de tratamento a concentração de inibição de amastigota intracelular variou entre 2,63 (*L. aethiopica*) a 37,17 µM (*L. major*) demonstrando diferenças de sensibilidade ao composto entre as espécies (102).

O tempo de incubação utilizado no nosso estudo baseou-se nos estudos de infecção em PBMC canino, no qual se avaliou os níveis da enzima N-acetyl-p-glucosaminidase (NAG) em sobrenadante de cultura de macrófagos e não se observou diferença na taxa de internalização de amastigota de *L. infantum* entre 24h (75,9%) e 72h (76,7%) (101).

A diferença entre as concentrações de inibição de amastigota intracelular pode estar relacionada a fatores ligados à droga, à capacidade de infecção da cultura de parasitos, à ação microbicida do macrófago e aos diferentes modelos utilizados. Esses fatores podem ter influenciado na diferença da resposta observada frente à ação da miltefosina e do (-)- α -bisabolol no PBMC, L929 e macrófagos peritoneais de camundongos infectados com *Leishmania*.

A ação do (-)- α -bisabolol contra infecção de *L. infantum* foi demonstrada pela observação da diminuição de crescimento de amastigota intracelular, além da redução de mais de 80% do número de células mononucleares infectadas e diminuição do número de amastigota intracelular quando se utilizou a concentração de 135 μ M. O oposto do observado nas células infectadas e não tratadas as quais demonstraram um número maior de amastigota intracelular assim como um grande número de células infectadas.

O (-)- α -bisabolol auxiliou de forma positiva no combate a infecção intracelular agindo diretamente no parasito, sem causar toxicidade à célula. A sua efetividade pode ser explicada devido à presença de hidroxila em sua estrutura química, promovendo a ação microbicida (11,104). O grupo hidroxila presente na estrutura do (-)- α -bisabolol pode formar ligações de átomos de hidrogênio eletronegativos em proteínas. Com o acúmulo dessas ligações, ocorrem mudanças estruturais e funcionais em proteínas de superfície, como também em outros componentes de origem proteica que interagem com a membrana. Por conseguinte, qualquer alteração na estrutura de proteínas celulares por esses compostos ativos de origem natural ocasionará em um impacto adverso à sobrevivência do organismo (87). Devido a sua natureza lipofílica, o (-)- α -bisabolol, assim como outros óleos orgânicos voláteis, possui a capacidade de penetrar na membrana plasmática e formar ligações hidrofóbicas com cadeias de fosfolipídeos. Essas ligações hidrofóbicas contribuem para a perda de integridade e funcionalidade da membrana. As alterações nas propriedades proteicas da membrana causam um desarranjo celular, o qual propicia aumento da permeabilidade e fluidez intra e extracelular. Por consequência disso, há uma disfunção de organelas e posteriormente um colapso celular (87,106).

A miltefosina age como um modulador lipídico e interfere na organização estrutural dos receptores de superfície na membrana celular (75). Estudos utilizando um marcador de spin específico para tiol ligado a proteínas de membrana de *L. amazonensis* e macrófagos peritoneais, mostraram que a miltefosina pode se ligar às proteínas da membrana plasmática em grandes quantidades por meio de uma ação semelhante à ação observada com o uso de

detergentes e causar mudanças estruturais associadas a um aumento acentuado na dinâmica e exposição a um ambiente aquoso. Observaram um aumento acentuado na fluidez da membrana das células tratadas com essa droga e verificaram que a citotoxicidade da miltefosina foi dependente da concentração de células utilizada no ensaio. A miltefosina causa um aumento significativo na dinâmica destas membranas para concentrações similares àquelas que inibem o crescimento do parasito ou que são citotóxicas ao macrófago e interage predominantemente com a componente proteico da membrana. Os resultados mostraram que houve diminuição da viabilidade celular após o tratamento com miltefosina com IC₅₀ de 137±15 µM, quantificada pela redução do sal MTT (103).

Existem variados métodos para explicar os mecanismos de ação de óleos essenciais ou de compostos isolados. Os principais mecanismos descritos são de ação direta ao parasito ou produção de atividade imunomodulatória (107).

De acordo com os resultados dos ensaios em promastigotas e amastigotas intracelulares, consideramos que o (-)- α -bisabolol é capaz de provocar mudanças na membrana celular dos parasitos, como observado pela presença de projeções de membrana citoplasmática nos parasitos tratados, o que não foi observado nos parasitos não tratados que apresentaram organelas preservadas. O aumento da permeabilidade induzido pelo (-)- α -bisabolol pode auxiliar na absorção de componentes exógenos, potencializando sua ação contra *L. infantum* (108).

No presente estudo, por meio de microscopia eletrônica de transmissão foi possível observar a ação direta do (-)- α -bisabolol sobre os parasitos. As alterações morfológicas encontradas concordam com achados em promastigotas de *L. amazonensis* tratados com (-)- α -bisabolol que apresentaram inclusões lipídicas no citoplasma, cinetoplasto aumentado de volume e descontinuidade de membrana nuclear e mitocôndrias após 24h de tratamento (89),. Do mesmo modo, mudanças estruturais também foram constatadas em *Trypanosoma cruzi* (109).

As alterações em nível mitocondrial e nuclear são consideradas cruciais para efetividade de biomoléculas contra parasitos (110). Sugere-se que as mitocôndrias são as primeiras organelas sensibilizadas pelo produto natural, como foi observado em promastigotas de *L. amazonensis*, os quais apresentaram mudanças morfológicas após 2h de tratamento (11). De fato, a maior parte da energia fornecida à célula provém de processos metabólicos mitocondriais, por isso são considerados os principais alvos citotóxicos de diferentes produtos naturais e sintéticos.

Em virtude da ação de compostos bioativos alterando a permeabilidade celular; os produtos de processos energéticos naturais são transformados em espécies reativas de oxigênio (ROS). Os ROS são compostos altamente reativos e instáveis que reagem com diversas biomoléculas produzindo sérios danos celulares e indução à apoptose (87). As falhas no desempenho mitocondrial podem ser avaliadas a partir de diferentes níveis de despolarização de membrana; os quais geralmente somados ao estresse oxidativo precedem os processos de morte celular (111). A condensação de cromatina e a intensa fragmentação do DNA, dentre outros, são característicos de processos apoptóticos (112).

A morte celular é um evento regulado geneticamente que resulta em uma desordem nas vias de sinalização celular levando o sistema ao colapso. Essa regulação é dependente da estimulação de proteases de cisteína precisamente caspases, ativadas por sinais apoptóticos específicos. As caspases atuam em diversos substratos como, por exemplo, na quebra de proteínas vitais e na intensificação dos estímulos de morte celular programada (113). A Bcl-2 é uma caspase que atua na permeabilidade da membrana mitocondrial, quando ativada potencializa a tradução de sinal e efetivação da apoptose. Existem outras proteínas pró-apoptóticas- Bax, Bcl-Xs, Bak, Bid e Bad que atuam na diminuição do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) (114). O (-)- α -bisabolol demonstrou indução de apoptose em *L. tropica* em concentrações dose e tempo dependente, com diminuição do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) e produção de ROS propiciando interrupção da atividade mitocondrial (115).

Diversos medicamentos direcionados ao tratamento das leishmanioses provocam apoptose dependente como mecanismo de ação, do mesmo modo que diversos compostos bioativos antiparasitários, como monoterpenos presentes em óleo essencial de *Thymus capitellatus* na concentração de 37 $\mu\text{g/mL}$ (IC_{50}) provocou condensação de cromatina nuclear em promastigotas de *Leishmania* (116). A capacidade de (-)- α -bisabolol de provocar apoptose em agentes infecciosos é similar ao seu efeito citotóxico em células neoplásicas, somado a regulação inibitória de fatores anti-apoptóticos e de proliferação celular (99,100). Essa particularidade do (-)- α -bisabolol justifica a citotoxicidade observada nas células DH82, e em outras células tumorais de linhagem humana, como panc28 (neoplasia de células pancreáticas) e A293 (neoplasia de células renais) (98, 117, 118).

A ausência de citotoxicidade do (-)- α -bisabolol para PBMC de cães e outras células de mamíferos corrobora com achados observados em fibroblastos L929 ($\text{CC}_{50} >1000 \mu\text{M}$) oriundos de medula óssea de ratos CD-1 (104).

O $IS > 10$ é um dos parâmetros considerados na triagem de novos compostos antiparasitários (119). No presente estudo, o (-)- α -bisabolol apresentou IS dentro dos parâmetros estabelecidos pelo DNDi (Drugs for Neglected Diseases Initiative), o qual foi superior ao observado no modelo in vitro com células L929 infectadas com para *L. infantum* e *L. donovani*, o qual apresentou $IS > 17$ e > 25 ; respectivamente (118). De forma semelhante a miltefosina apresentou IS dentro dos parâmetros descritos acima.

A eficácia do (-)- α -bisabolol sugere uma ação sob o parasito diretamente ou indiretamente por ativação de mecanismos celulares nos macrófagos, principalmente a modulação da produção de citocinas e óxido nítrico (NO) bem como inibição de fatores propícios ao crescimento de amastigota intracelular. A ação antiinflamatória do (-)- α -bisabolol foi descrita desenvolvendo inibição de PGE_2 e aumento da produção de NO (19). Para o modelo de infecção de *L. infantum* isso se torna relevante uma vez que PGE_2 favorece a sobrevivência amastigota no interior de macrófagos.

Em células dendríticas, o (-)- α -bisabolol provocou inibição de secreção de diferentes citocinas relacionadas com a resposta Th1 como IL-12 (120). As citocinas IL 12 e IFN- γ integram importantes mecanismos de defesa em macrófagos infectados, sobretudo no curso de leishmaniose visceral canina, na qual o IFN- γ é considerado uma citocina protetora estando em níveis mais altos nos animais sintomáticos (121). O tratamento com (-)- α -bisabolol (30 mg/kg do produto via oral diariamente por 28 dias) foi efetivo em cães naturalmente infectados e induziu aumento expressão de IFN- γ (52), sugerindo um efeito imunomodulador deste sesquiterpeno. Da mesma forma, estudos com a miltefosina mostram que esta promove uma resposta imunológica anti-leishmania via IFN- γ , induzindo resposta Th1 dependente de IL-12 (75,122).

A imunomodulação da geração de óxido nítrico tem sido proposta como um dos mecanismos de ação de bioativos de óleos essenciais e terpenos como o (-)- α -bisabolol (123). A produção do NO é mediada pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) ativada por fatores ligados a degradação de material por fagocitose. Os macrófagos utilizam a produção de NO para potencializar a resposta contra *Leishmania*, bem como em outros patógenos. Dentre os efeitos diretos do NO em patógenos pode-se citar o bloqueio da multiplicação, genotoxicidade, inibição de vias metabólicas e fatores de virulência, além de regulação inibidora de agrupamentos de Fe^+ . O ferro é um elemento essencial requerido pelo parasito para crescimento e sobrevivência, adquirido por transportadores heme férrico e ferroso,

qualquer desequilíbrio entre esses grupos influencia positivamente na defesa contra *Leishmania* (39,124).

As evidências observadas em relação às propriedades e mecanismos leishmanicida apresentadas pelo (-)- α -bisabolol o colocam como um composto promissor para o desenvolvimento de um tratamento alternativo nas leishmanioses. Contudo, há necessidade de estudos aprofundados sobre as suas características farmacodinâmicas e farmacocinéticas, ainda não elucidadas. Com isso abrem-se novas perspectivas para pesquisas que possam contribuir para o desenvolvimento de novas terapias contra as leishmanioses, com maior viabilidade e baixa toxicidade.

6. CONCLUSÕES

O (-)- α -bisabolol apresentou atividade leishmanicida contra formas promastigotas de *L. infantum* tempo e concentração dependente.

O (-)- α -bisabolol não apresentou toxicidade na concentração analisadas em PBMC e baixa toxicidade para células DH82.

O (-)- α -bisabolol apresentou atividade leishmanicida contra amastigota intracelular de *L. infantum* após 24h de tratamento.

O (-)- α -bisabolol provocou alterações ultraestruturais citoplasmáticas nas formas promastigotas de *L. infantum*.

7. REFERÊNCIAS

1. Hitziger M, Esposito R, Canali M, Aragrande M, Rüegg SR. Knowledge integration in One Health policy formulation , implementation and evaluation. Bull World Heal Organ. 2018;96:211–8.
2. Ross R. Note on the bodies recently described by leishman and donovan. Br Med J. 1903;2:1261–2.
3. Chappuis F, Sundar S, Hailu A, Ghalib H, Rijal S, Peeling RW, Alvar J BM. Visceral leishmaniasis : what are the needs for diagnosis , treatment and control ? Nat Microbiol. 2007;5:873–82.
4. Wha R, Assembly WH, States M, States M, Obser GH. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. 2017.
5. Harhay MO, Olliaro PL, Costa DL, Costa CHN. Urban parasitology: Visceral leishmaniasis in Brazil. Trends Parasitol. 2011;27:403–9.
6. Otranto D, Dantas-Torres F. The prevention of canine leishmaniasis and its impact on public health. Trends Parasitol. 2013;29:339–45.
7. Solano-gallego L, Miró G, Koutinas A, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. LeishVet guidelines for the practical management of canine leishmaniosis. Parasit Vectors. 2011;4:1–16.
8. Miró G, Petersen C, Cardoso L, Bourdeau P, Baneth G, Solano-gallego L, et al. Novel areas for prevention and control of canine leishmaniosis. Trends Parasitol. 2017;33:718–30.
9. Quinzel, R. J. Coutenay O. Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis. Parasitology. 2009;136:1915–34.
10. Fiscalização CDE, Cpv DEPV. Nota técnica nº 11/2016/cpv/dfip/sda/gm/mapa. 2016. p. 1–2.
11. Margatto M, Claudia A, Amaral F, Luiz J, Ferreira P, Rocha J, et al. In vitro evaluation of (-)- α -bisabolol as a promising agent against *Leishmania amazonensis*. Exp Parasitol. 2015;148:66–72.
12. Almeida-souza F, Freitas S, Souza D, Silva M, Mond R, Nosomi N, et al. *Morinda citrifolia* Linn . fruit (Noni) juice induces an increase in NO production and death of *Leishmania amazonensis* amastigotes in peritoneal macrophages from balb/c. Nitric Oxide. 2016;58:51–8.
13. Almeida-souza F, Taniwaki NN, Cláudia A, Amaral F, Freitas S, Calabrese S, et al. Ultrastructural changes and death of *Leishmania infantum* promastigotes induced by *Morinda citrifolia* Linn . Fruit (Noni) juice treatment. Complement Altern Med. 2016;2016:1–10.
14. Oliveira A, Izumi E, Ueda-nakamura T, Dias-filho BP, Veiga-júnior VF, Nakamura CV. Antileishmanial activity of diterpene acids in *copaiba* oil. Mem Inst Oswaldo Cruz. 2013;108(1):59–64.

15. Valadares DG, Duarte MC, Oliveira JS, Chávez-fumagalli MA, Martins VT, Costa LE, et al. Leishmanicidal activity of the *Agaricus blazei* Murill in different *Leishmania* species. *Parasitol Int.* 2011;60:357–63.
16. Andersen FA. *International Journal of Toxicology.* 1999;
17. Chirumbolo S, Bjørklund G. The sesquiterpene (-)- α -bisabolol in the adipocyte-cancer desmoplastic crosstalk: does it have an action on epithelial- mesenchymal transition mechanisms? *Int J Clin Oncol.* 2017;22:222–8.
18. Kurekci C, Padmanabha J, Bishop-hurley SL, Hassan E, Al RAM, Mcsweeney CS. Antimicrobial activity of essential oils and five terpenoid compounds against *Campylobacter jejuni* in pure and mixed culture experiments. *Int J Food Microbiol.* 2013;166:450–7.
19. Kim S, Jung E, Kim J, Park Y, Lee J, Park D. Inhibitory effects of (-)- α -bisabolol on LPS-induced inflammatory response in RAW264.7 macrophages. *Food Chem Toxicol.* 2011;49:2580–5.
20. Dias DMM, Paumgartten FJR. Evaluation of mutagenic and antimutagenic activities of (-)- α -bisabolol in the *Salmonella* / microsome assay. *Mutat Res.* 2005;585:105–12.
21. M. Morales-Yuste, F. Morillas-Marquez, J. Martín-Sanchez, A. Valero-López MCN-M. Activity of (-)- α -bisabolol against *Leishmania infantum* promastigotes. *Phytomedicine.* 2010;17:279–81.
22. Kaufer A, Ellis J, Stark D, Barratt J. The evolution of trypanosomatid taxonomy. *Parasit Vectors.* 2017;10:1–17.
23. Sinval P. Brandão-Filho, Maria E. Brito, Francisco G. Carvalho, Edna A. Ishikawa, Elisa Cupolillo, Lucile Floeter-Winter JJS. Wild and synanthropic hosts of *Leishmania (Viannia) braziliensis* in the endemic cutaneous leishmaniasis locality of Amaraji , Pernambuco State , Brazil. *Trop Med Hyg.* 2003;97:291–6.
24. Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) OM da S (OMS). Organização Pan-Americana da Saúde: Leishmanioses: Informe Epidemiológico nas Américas [Internet]. Vol. 2, Informe Epidemiológico das Américas Leishmanioses. 2017. p. 1–4. Available from: <http://www.paho.org>
25. World Health Organization. Leishmaniasis. In: Investing to overcome the global impact of neglected tropical diseases. 2015. p. 139.
26. Carlos José Saldanha Machado, Erica Gaspar Silva RMV. O uso de um instrumento de política de saúde pública controverso: a eutanásia de cães contaminados por leishmaniose no Brasil. *Saúde e Soc.* 2016;25:247–58.
27. Salomón OD, Quintana MG, Bezzi G, Morán ML, Betbeder E, Valdéz D V. *Lutzomyia migonei* as putative vector of visceral leishmaniasis in La Banda , Argentina. *Acta Trop.* 2010;113:84–7.
28. Nanci Akemi Missawa, Márcia Aurélio Esser Veloso, Giovana Belem Moreira Lima Maciel, Érika Monteiro Michalsky ESD. Evidência de transmissão de leishmaniose visceral por *Lutzomyia cruzi* no município de Jaciara , Estado de Mato Grosso , Brasil. *Soc Bras Med Trop.* 2011;44:76–8.
29. M. Maroli, M. D. Feliciangeli, L. Bichaud, R. N. Charrel LG. Phlebotomine sandflies

- and the spreading of leishmaniasis and other diseases of public health concern. *Med Vet Entomol.* 2013;27:123–47.
30. Barbosa DS, Belo S, Jose C, Werneck GL. Risk factors for adverse prognosis and death in american visceral leishmaniasis: a meta-analysis. *PLoS Negl Trop Dis.* 2014;8:1–9.
 31. Pearson RD, Sousa ADQ. Clinical spectrum of leishmaniasis. *Clin Infect Dis.* 1996;22:1–13.
 32. Bates PA. Transmission of *Leishmania* metacyclic promastigotes by phlebotomine sand flies. *Int J Parasitol.* 2007;37:1097–106.
 33. Kamhawi S. Phlebotomine sand flies and *Leishmania* parasites: friends or foes? 2006;22(9).
 34. Pace D. Leishmaniasis. 2014;10–8.
 35. Dantas-Torres F, Solano-Gallego L, Baneth G, Ribeiro VM, de Paiva-Cavalcanti M, Otranto D. Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: Unveiled similarities and differences. *Trends Parasitol.* 2012;28:531–8.
 36. Handman E, Bullen DVR. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitol.* 2002;18(8):332–4.
 37. M. E. Rogers, M. L. Chance PAB. The role of promastigote secretory gel in the origin and transmission of the infective stage of *Leishmania mexicana* by the sandfly *Lutzomyia longipalpis*. *Parasitology.* 2002;124:495–507.
 38. Ueno N, Wilson ME. Receptor-mediated phagocytosis of *Leishmania*: implications for intracellular survival. *Parasitology.* 2012;28:335–44.
 39. Podinovskaia M, Descoteaux A. *Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction. *Futur Med Microbiol.* 2015;10:111–29.
 40. Metzdorf IP, da Costa Lima MS, de Fatima Cepa Matos M, de Souza Filho AF, de Souza Tsujisaki RA, Franco KG, et al. Molecular characterization of *Leishmania infantum* in domestic cats in a region of Brazil endemic for human and canine visceral leishmaniasis. *Acta Trop.* 2017;166:121–5.
 41. Marinho W, Coelho D, Richini-pereira VB, Langoni H, Denise K, Bresciani S. Molecular detection of *Leishmania* sp . in cats (*Felis catus*) from Andradina Municipality, São Paulo State, Brazil. *Vet Parasitol.* 2011;176:281–2.
 42. MS. Nota Informativa: Tratamento de cães com leishmaniose visceral. 2016;1.
 43. Dantas-Torres F. Canine leishmaniosis in South America. *Parasites and Vectors.* 2009;2:1–8.
 44. IBGE. População de animais de estimação no Brasil [Internet]. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. 2013. p. 7. Available from: <http://www.agricultura.gov.br/assuntos/camaras-setoriais-tematicas/documentos/camaras-tematicas/insumos-agropecuarios/anos-anteriores/ibge-populacao-de-animais-de-estimacao-no-brasil-2013-abinpet-79.pdf/view>
 45. Martín-Sánchez J, Acedo C, Muñoz-Pérez M, Pesson B, Marchal O, Morillas-Márquez F. Infection by *Leishmania infantum* in cats: epidemiological study in Spain. *Vet*

- Parasitol. 2007;145:267–73.
46. Ribeiro RR, Suzan M, Michalick M, Eduardo M, Cheim C, Jean F, et al. Canine leishmaniasis : an overview of the current status and strategies for control. *Biomed Res Int.* 2018;2018:1–12.
 47. M. M. S. Costa, W. G. Lima, M. M. Figueiredo, M. S. Michalick WLT and LT. Cervical, mandibular and parotid lymph nodes of dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: a histopatologic and immunohistochemistry study and its correlation with facial skin lesions. *Vet Pathol.* 2008;45:613–6.
 48. Melo FA, Moura EP, Ribeiro RR, Alves F, Caliari V, Tafuri WL. Hepatic extracellular matrix alterations in dogs naturally infected with *Leishmania* (*Leishmania*) *chagasi*. *Exp Parasitol.* 2009;90:538–48.
 49. Brasil M da S. Manual de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral [Internet]. Secretaria de Vigilância em Saúde. 2014. 120 p. Available from: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_visceral_1edicao.pdf
 50. Silva FS. Patologia e patogênese da leishmaniose visceral canina. *Trópica.* 2007;1:16.
 51. Gálvez R, Miró G, Descalzo MA, Molina R. Questionnaire-based survey on the clinical management of canine leishmaniosis in the Madrid region (central Spain). *Prev Vet Med.* 2011;102:59–65.
 52. López VC, Espinosa GM, Sánchez CA, Sáez VD, Moll MCN. Effectiveness of the sesquiterpene (-)- α -bisabolol in dogs with naturally acquired canine leishmaniosis: an exploratory clinical trial. *Vet Res Commun.* 2018;42:121–30.
 53. Cristina T, Vasconcelos B De, Doyen N, Cavaillon J, Freire S, Paiva M, et al. Cytokine and iNOS profiles in lymph nodes of dogs naturally infected with *Leishmania infantum* and their association with the parasitic DNA load and clinical and histopathological features. *Vet Parasitol.* 2016;227:8–14.
 54. Papadogiannakis EI, Koutinas AF. Cutaneous immune mechanisms in canine leishmaniosis due to *Leishmania infantum*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2015;163:94–102.
 55. Saridomichelakis MN. Advances in the pathogenesis of canine leishmaniosis : epidemiologic and diagnostic implications. *Vet Dermatol.* 2009;20:471–89.
 56. Papadogiannakis EI, Koutinas AF, Saridomichelakis MN. Cellular immunophenotyping of exfoliative dermatitis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*). *Vet Immunol Immunopathol.* 2005;104:227–37.
 57. Quinnell RJ, Courtenay O, Shaw M, Day MJ, Garcez LM, Dye C, et al. Tissue cytokine responses in canine visceral leishmaniasis. *J Infect Diseases.* 2001;183:1421–4.
 58. Dalit S, Gad B, Charles LJ. Splenic immune responses during canine visceral leishmaniasis. *Vet Res.* 2007;38:547–64.
 59. Lage RS, Oliveira GC, Busek SU, Guerra LL. Analysis of the cytokine profile in spleen cells from dogs naturally infected by *Leishmania chagasi*. *Vet Immunol Immunopathol.* 2007;115:135–45.

60. Hosein S, Blake DP, Solano-gallego L. Insights on adaptive and innate immunity in canine leishmaniosis. *Parasitol.* 2017;144:95–115.
61. Faria AR, Andrade HM de. Diagnóstico da Leishmaniose Visceral Canina: grandes avanços tecnológicos e baixa aplicação prática. *Rev Pan-Amazônica Saúde.* 2012;3:47–57.
62. Werneck GL, Costa CHN, Walker AM, David JR, Wand M, Maguire JH. The urban spread of visceral leishmaniasis: clues from spatial analysis. *Epidemiology.* 2002;13:364–7.
63. Solano-Gallego L, Koutinas A, Miró G, Cardoso L, Pennisi MG, Ferrer L, et al. Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis. *Vet Parasitol.* 2009;165:1–18.
64. Saúde BM da SS de V em S. Guia de vigilância em saúde. Vol. 3. 2017. 286 p.
65. Gharbi M, Mhadhbi M, Reje A, Jaouadi K, Roua M, Darghouh MA. Leishmaniosis (*Leishmania infantum* infection) in dogs. *Rev Sci Tech l'OIE.* 2015;34:613–26.
66. Quinnell RJ, Soremekun S, Bates PA, Rogers ME, Garcez LM, Courtenay O. Antibody response to sand fly saliva is a marker of transmission intensity but not disease progression in dogs naturally infected with *Leishmania infantum*. *Parasit Vectors.* 2018;11:7.
67. Costa CHN. Characterization and speculations on the urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil. *Cad Saude Publica.* 2008;24:2959–63.
68. Soares MRA, Mendonça IL de, Bonfim JM do, Rodrigues JA, Werneck GL, Costa CHN. Canine visceral leishmaniasis in Teresina, Brazil: relationship between clinical features and infectivity for sand flies. *Acta Trop.* 2011;117:6–9.
69. Werneck GL. Visceral leishmaniasis in Brazil: Rationale and concerns related to reservoir control. *Rev Saude Publica.* 2014;48:851–6.
70. Romero GAS, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in latin America - A systematic review. *PLoS Negl Trop Dis.* 2010;4.
71. Reithinger R, Coleman PG, Alexander B, Vieira EP, Assis G, Davies CR. Are insecticide-impregnated dog collars a feasible alternative to dog culling as a strategy for controlling canine visceral leishmaniasis in Brazil? *Int J Parasitol.* 2004;34:55–62.
72. Miró G, Gálvez R, Mateo M, Montoya A, Descalzo MA, Molina R. Evaluation of the efficacy of a topically administered combination of imidacloprid and permethrin against *Phlebotomus perniciosus* in dog. *Vet Parasitol.* 2007;143:375–9.
73. Gontijo, Célia Maria Ferreira; Melo M norma. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol.* 2004;7:338–49.
74. Noli C, Saridomichelakis MN. An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by *Leishmania infantum* (syn. *L. chagasi*). *Vet J.* 2014;202:425–35.
75. Wadhone P, Maiti M, Agarwal R, Martin S, Saha B, Wadhone P, et al. Miltefosine promotes IFN- γ -dominated anti-leishmanial immune response. *J Immunol.* 2018;182:7146–54.

76. Andrade HM, Toledo VPCP, Pinheiro MB, Guimarães TMPD, Oliveira NC, Castro JA, et al. Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil. *Vet Parasitol.* 2011;181:83–90.
77. Woerly V, Maynard L, Sanquer A, Eun H. Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis. *Parasitol Res.* 2009;105:463–9.
78. Reguera R, García-estrada C, Balaña-fouce R, Bala R. Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis. *Vet Parasitol.* 2016;227:98–114.
79. Monge-maillo B, López-vélez R. Miltefosine for visceral and cutaneous leishmaniasis : drug characteristics and evidence-based treatment recommendations. *Clin Infect Dis.* 2015;60:1398–404.
80. Rijal S, Ostyn B, Uranw S, Rai K, Bhattarai NR, Dorlo TPC, et al. Increasing failure of miltefosine in the treatment of Kala-azar in nepal and the potential role of parasite drug resistance , reinfection , or noncompliance. *Clinical Infect Dis.* 2013;19:1–9.
81. Proverbio D, Spada E, Giorgi GB De, Perego R. Failure of miltefosine treatment in two Dogs with natural *Leishmania infantum* infection. Vol. 2014. 2014.
82. Freitas-Junior LH, Chatelain E, Kim HA, Siqueira-Neto JL. Visceral leishmaniasis treatment: What do we have, what do we need and how to deliver it? *Int J Parasitol Drugs Drug Resist.* 2012;2:11–9.
83. Dhiraj Kumar, Ruchi Singh, Vansundhra Bhandari, Arpita Kulshrestha, Narendra Singh Negi PS. Biomarkers of antimony resistance: need for expression analysis of multiple genes to distinguish resistance phenotype in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Parasitol Res.* 2012;111:223–30.
84. Purkait B, Kumar A, Nandi N, Sardar AH, Das S, Kumar S, et al. Mechanism of amphotericin B resistance in clinical isolates of *Leishmania donovani*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2012;56:1031–41.
85. Diniz V, Almeida-souza F, Mara A, Azalim P, Mondego-oliveira R, Everton N, et al. Chemical composition of *Ocimum canum Sims* . essential oil and the antimicrobial , antiprotozoal and ultrastructural alterations it induces in *Leishmania amazonensis* promastigotes. *Ind Crop Prod.* 2018;119:201–8.
86. Islamuddin M, Chouhan G, Want MY, Tyagi M, Abdin MZ. Leishmanicidal activities of *Artemisia annua* leaf essential oil against visceral leishmaniasis. *Front Microbiol.* 2014;5:1–15.
87. Singh I. Antimicrobials in higher plants: classification , mode of action and bioactivities. Vol. 4, *Chemical Biology Letters.* 2017. 48-62 p.
88. Barreto RSS, Quintans JSS, Amarante KL, Nascimento TS, Rosana S, Barreto AS, et al. Evidence for the involvement of TNF- α and IL-1 β in the antinociceptive and antiinflammatory activity of *Stachys lavandulifolia* Vahl. (*Lamiaceae*) essential oil and (-)- α - bisabolol, its main compound, in mice. *J Ethnopharmacol.* 2016;191:9–18.
89. Colares AV, Almeida-souza F, Taniwaki NN, Freitas S, Galberto J, Calabrese S, et al. In Vitro antileishmanial activity of essential oil of *vanillosmopsis arborea (Asteraceae)* Baker. *Complement Altern Med.* 2013;2013:1–8.
90. Fiume MM. Bisabolol. *Int J Toxicol.* 2017;36:24–5.

91. Cavalieri E, Mariotto S, Fabrizi C, Prati C De, Gottardo R, Leone S, et al. α -Bisabolol, a nontoxic natural compound, strongly induces apoptosis in glioma cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;315:589–94.
92. Façanha G, Teixeira D, Nogueira F, Rolim A, Fac G. Corneal antinociceptive effect of (-)- α -bisabolol. *Pharmaceutical Biology.* Informa Healthcare USA, Inc; 2017. p. 1089–92.
93. Hévila L, Leite I, Leite GDO, Coutinho TS, Denício S, Sousa G De, et al. Topical antinociceptive effect of *Vanillosmopsis arborea* Baker on acute corneal pain in mice. *Complement Altern Med.* 2014;2014:1–6.
94. Flávio N, Rocha M, Ricardo E, Rios V. Anti-nociceptive and anti-inflammatory activities of (-)- α -bisabolol in rodents. *Naunyn-Schmiedeberg's Arch Pharm.* 2011;384:525–33.
95. Lima T, Róseo R, Pessoa P, Menezes B De, Felipe M, Cavalcante G, et al. Nephroprotective effects of gainst ischemic-reperfusion acute kidney injury. *Phytomedicine.* 2016;23:1843–52.
96. Vena ET, Cle F. Gastroprotection of (-)- α -bisabolol on acute gastric mucosal lesions in mice: the possible involved pharmacological mechanisms. *Fundam Clin Pharmacol.* 2010;24:63–71.
97. Alina Matuszak-Flejszman DP-M, Marek, Piotr Ceryngier dr hab. inż. DG, Monika Binkowska. Science, researches, scientific reports. Tobiasz Wysoczański, editor. 2018;314.
98. Brehm-stecher BF, Johnson EA, Brehm-stecher BF, Johnson EA. Sensitization of *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli* to antibiotics by the sesquiterpenoids nerolidol , farnesol , bisabolol and apritone. *Antimicrob Agents Chemother.* 2003;47:3357–60.
99. Uno M, Kokuryo T, Yokoyama Y, Senga T, Nagino M. (-)- α -bisabolol inhibits invasiveness and motility in pancreatic cancer through KISS1R activation. *Anticancer Res.* 2016;36:583–9.
100. Guesmi F, Prasad S, Tyagi AK, Landoulsi A. Antinflammatory and anticancer effects of terpenes from oily fractions of *Teucrium alopecurus*, blocker of I κ B α kinase, through downregulation of NF- κ B activation, potentiation of apoptosis and suppression of NF- κ B regulated gene expression. *Biomed Pharmacother.* 2017;95:1876–85.
101. Kelvinson Fernandes Viana, Rodrigo Dian Oliveira Aguiar-Soares O, Mendes B, Aparecida L, Silveira-lemos D, Corrêa-oliveira R, Martins-filho OA, et al. Analysis using canine peripheral blood for establishing in vitro conditions for monocyte differentiation into macrophages for *Leishmania chagasi* infection and T-cell subset purification. *Vet Parasitol.* 2013;198:62–71.
102. Escobar P, Matu S, Croft SL. Sensitivities of *Leishmania* species to hexadecylphosphocoline (miltefosine), ET-18-OCH3 (edelfosine) and amphotericin B. *Acta Trop.* 2002;81:151–7.
103. Souza K, Eduardo P, Souza N De, Leandro M, Alonso A. The cytotoxic activity of miltefosine against *Leishmania* and macrophages is associated with dynamic changes

- in plasma membrane proteins. *Biochim Biophys Acta*. 2017;1859:1–9.
104. Victoriano Corpaz-López, Francisco Morillas-Márquez, M. Concepción Navarro-Moll, Gemma Merino-Espinosa, Victoriano Díaz-Sáez JM-S. (-)- α -Bisabolol , a promising oral compound for the treatment of visceral leishmaniasis. *J Nat Prod* . 2015;78:1202–7.
 105. Croft SL, Snowdon D, Yardley V. The activities of four anticancer alkyllysophospholipids against *Leishmania donovani* , *Trypanosoma cruzi* and *Trypanosoma brucei*. *J Antimicrob Chemother*. 1996;(38):1041–7.
 106. Freire G, Medeiros D, Caroline A, Maria A, Citó L, Raposo A, et al. In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham. *Parasitol Int*. 2011;60(3):237–41.
 107. Thanh Binh Le^{1, 2,*}, Claire Beaufay¹, Natacha Bonneau¹, Marie-Paule Mingeot-Leclercq³ JQ-L. Anti-protozoal activity of essential oils and their constituents against *Leishmania* , *Plasmodium* and *Trypanosoma*. *ISTE*. 2018. p. 1–33.
 108. Sousa F De, Sampaio T, Freitas D, Pereira R, Araújo T De, Menezes P, et al. Evaluation of the antibacterial and modulatory potential of α - bisabolol, b-cyclodextrin and a-bisabolol/b-cyclodextrin complex. *Biomed Pharmacother*. 2017;92:1111–8.
 109. Baldissera MD, Grando TH, Souza CF De, Cossetin LF, Silva APT, Giongo JL, et al. A nanotechnology based new approach for *Trypanosoma evansi* chemotherapy: in vitro and vivo trypanocidal effect of (-)- α -Bisabolol. *Exp Parasitol*. 2016;170:156–60.
 110. Bakkali F, Idaomar M. Biological effects of essential oils- a review. *Food Chem Toxicol*. 2008;46:446–75.
 111. V. Corpas-López, G. Merino-Espinosa, V. Díaz- Sáez, F. Morillas-Márquez, M. C. Navarro-Moll JM-S. The sesquiterpene (-)- α -bisabolol is active against the causative agents of Old World cutaneous leishmaniasis through the induction of mitochondrial-dependent apoptosis. *Apoptosis*. 2016;21:1071–81.
 112. Love S. Apoptosis and brain ischaemia. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2003;27:267–82.
 113. Jorgensen I, Rayamajhi M, Miao EA. Programmed cell death as a defence against infection. *Nat Publ Gr*. 2017;17:151–4.
 114. Wu X, Zhang L, Toombs J, Kuo Y, Piazza JT, Tuladhar R, et al. Extra-mitochondrial prosurvival BCL-2 proteins regulate gene transcription by inhibiting the SUFU tumour suppressor. *Nat Cell Biol*. 2017;19:1226–36.
 115. Di GM V. The sesquiterpene (-)- α -bisabolol is active against the causative agents of Old World cutaneous leishmaniasis through the induction of mitochondrial-dependent apoptosis. *Apoptosis*. 2016;21:1071–81.
 116. Machado M, Dinis AM, Santos-rosa M, Alves V, Salgueiro L. Activity of *Thymus capitellatus* volatile extract, 1,8-cineole and borneol against *Leishmania* species. *Vet Parasitol*. 2014;200:39–49.
 117. Mathias D, Sartoratto A, Helena B, Noronha L De, Maia S, Paula JP De, et al. In vitro cytotoxic potential of essential oils of *Eucalyptus benthamii* and its related terpenes on tumor cell lines. *Evid Based-Complementary Altern Med*. 2012;2012:1–8.

118. Victoriano Corpaz-López, Francisco Morillas-Márquez, M. Concepción Navarro-Moll, Gemma Merino-Espinosa, Victoriano Díaz-Sáez and JM-S. (-)- α -Bisabolol, a Promising Oral Compound for the Treatment of Visceral Leishmaniasis. *J Nat Prod.* 2014;78(6):1202–7.
119. Rob Don J-RI. Screening strategies to identify new chemical diversity for drug development to treat kinetoplastid infections. *Parasitology.* 2014;141:140–6.
120. Marongiu L, Donini M, Bovi M, Perduca M, Vivian F, Romeo A, et al. The inclusion into PLGA nanoparticles enables α -bisabolol to efficiently inhibit the human dendritic cell pro- inflammatory activity. *J Nanoparticle Res.* 2014;16:2554.
121. Montserrat-sangr S, Ordeix L, Mart P. Parasite specific antibody levels , interferon- γ and TLR2 and TLR4 transcripts in blood from dogs with different clinical stages of leishmaniosis. *Vet Sci.* 2018;31:1–12.
122. Kumar A, Gupta G, Adhikari A, Majumder S, Kar S, Bhattacharyya S, et al. Miltefosine triggers a strong proinflammatory cytokine response during visceral leishmaniasis : Role of TLR4 and TLR9. *Int Immunopharmacol.* 2012;12:565–72.
123. Sharifi-rad J, Sureda A, Tenore GC, Daglia M, Sharifi-rad M, Valussi M, et al. Biological activities of essential oils : from plant Chemoecology to traditional healing systems. *Molecules.* 2017;70:1–55.
124. Müllerbner A, Dorighello GG, Kozlov A V, Catharina J, Bjertnæs LJ, Duvigneau JC. Interaction between mitochondrial reactive oxygen species, heme oxygenase, and nitric oxide synthase stimulates phagocytosis in macrophages. *Front Med.* 2018;4:1–10.
125. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia celular.* 7^o ed. Elsevier, 2011.
126. Anthony, J. P., Fyfe, L., Smith, H. Plant active components- a resource for antiparasitic agents. *Trends Parasitol.* 2005; 21:462-468.
127. Brodskyn, Claudia I.; Kamhawi, Shaden. Biomarkers for zoonotic visceral leishmaniasis in Latin America. *Frontiers in cellular and infection microbiology*, 2018; 8:1-10.