

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MARIANA DE SOUZA TERRON

Atividade anti-*Leishmania* do óleo essencial de *Tetradenia riparia* associado ao cetoconazol ou a anfotericina B, *in vitro*

Maringá

2017

UNIVERSIDADE ESTADUAL DE MARINGÁ
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE

MARIANA DE SOUZA TERRON

Atividade anti-*Leishmania* do óleo essencial de *Tetradenia riparia* associado ao cetoconazol ou a anfotericina B, *in vitro*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde.

Área de concentração: Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Maria Valdrinez Campana Lonardoní

Maringá

2017

FOLHA DE APROVAÇÃO

MARIANA DE SOUZA TERRON

Atividade anti-Leishmania do óleo essencial de Tetradenia riparia associado ao cetoconazol ou a anfotericina B, in vitro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Estadual de Maringá, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências da Saúde. Avaliada e aprovada pela comissão julgadora composta pelos membros:

Prof^a. Dr^a. Maria Valdrinez Campana Lonardoni
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Regiane Bertin de Lima Scodro
Universidade Estadual de Maringá

Dr^a. Tatiane França Perles
Universidade Estadual de Maringá

Prof^a. Dr^a. Zilda Cristiani Gazim
Universidade Paranaense

Aprovada em: 22 de fevereiro de 2017

Local da defesa: Sala 01, Bloco 126, *campus* da Universidade Estadual de Maringá

AGRADECIMENTOS

Primeiramente à Deus, por permitir que eu chegasse até aqui, proporcionando-me vida a cada dia, saúde e energia, iluminando-me e guiando meus passos;

Aos meus pais e minhas irmãs que são a minha base, sempre me apoiaram em todos os momentos da minha vida, acreditaram em mim e fizeram o possível e o impossível para que eu pudesse atingir todos os meus sonhos, além de compreenderem a minha ausência em muitos momentos;

Ao meu amor Marcos, que acompanhou todos os meus passos na pesquisa desde o início, sempre me apoiou, deu força e me incentivou para eu continuar firme no meu propósito;

À querida Prof. Dra. Maria Valdrinez Campana Lonardoni, minha orientadora, que como minha mãe científica compartilhou comigo toda a sua sabedoria, sempre confiou no meu trabalho, a quem eu admiro muito como pessoa, mulher e principalmente como pesquisadora;

À minha querida Prof. Dra. Izabel G. Demarchi, a quem eu admiro muito, foi a pessoa que abriu o caminho da pesquisa para mim, me ensinou a ser pesquisadora e que de professora da graduação se tornou uma grande amiga e parceira de trabalho, além de ser a minha inspiração como mulher e professora;

Às prof(s). Dra(s) Thaís e Sandra mulheres guerreiras, fortes, inspiradoras e admiráveis, que junto com Prof. Valdrinez, consolidaram o laboratório de Imunologia Clínica e a sua excelência na pesquisa em leishmaniose, e que sem elas nosso trabalho não seria possível. Sempre nos proporcionando momentos de amizade e conhecimento, nos dando todas as ferramentas para realizar nossos trabalhos;

Às minhas queridas amigas do laboratório Dani, Áquila, Laís, Taísa, Camila, Jully, Vanessa, Bárbara, Carol, Fabiana que com o companheirismo e amizade tornaram a minha caminhada mais leve, ajudando-me diretamente ou indiretamente no meu trabalho, meninas especiais e queridas, juntas formamos uma verdadeira equipe;

À Marinete, que com o seu jeito único de ser traz mais alegria e cor para o laboratório, além de ser nosso braço direito e a nossa engrenagem, sempre pronta para resolver tudo e nos apoiar em qualquer circunstância;

Às alunas Nianki, Ana Paula e Karine que me ajudaram durante parte dos meus experimentos, sempre interessadas e dispostas a aprender;

A todos os outros colegas do laboratório que, mesmo indiretamente, me ajudaram a completar a minha caminhada, com a convivência diária, apoio e companheirismo;

E, por fim, mas não menos importante, agradeço aos meus amigos de infância, da faculdade e da vida que também sempre me apoiaram, compreenderam a minha ausência em alguns momentos e que estiveram presentes em todas as minhas conquistas;

A todos esses e a outros que possam ter me apoiado de forma indireta para que eu pudesse chegar até aqui, meu MUITO OBRIGADA, pois como diz a frase: Sozinhos podemos chegar mais rápido, mas acompanhados com certeza chegaremos mais longe!

EPÍGRAFE

” Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é
senão uma gota de água no mar. Mas o mar seria
menor se lhe faltasse uma gota”

(MADRE TEREZA)

Atividade anti-*Leishmania* do óleo essencial de *Tetradenia riparia* associado ao cetoconazol ou a anfotericina B, *in vitro*

RESUMO

O presente estudo teve como objetivo avaliar as interações da associação do óleo essencial de *Tetradenia riparia* (TrEO) ao cetoconazol (KET) ou à anfotericina B (AmB) em *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e em células peritoneais murinas. Para isso, os parasitos e as células peritoneais murinas foram expostos a diferentes concentrações de TrEO, KET e AmB de forma individual e combinada utilizando a técnica de microdiluição de *checkerboard*, seguida da revelação pelo método colorimétrico de XTT. Os dados foram analisados de acordo com o método do índice de combinação de Chou-Talalay, por meio do software CompuSyn. Os valores de dose letal para 50% dos parasitos (DL₅₀) e citotoxicidade para 50% das células (CC₅₀) dos testes individuais e combinados foram calculados, bem como os parâmetros de interações como índice de combinação (CI), e índice de dose-redução (DRI). Os resultados obtidos estão apresentados em dois manuscritos: “Atividade anti-*Leishmania* da associação do óleo essencial de *Tetradenia riparia* e cetoconazol” e “Interações entre o óleo essencial de *Tetradenia riparia* e anfotericina B em promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*”. A DL₅₀ do TrEO, KET e AmB após 24 hrs de incubação foi de 0,34; 0,70 e 0,54 µg/ mL e a CC₅₀ foi de 0,125; 40 e 10,36 µg/ mL, respectivamente. Na interação entre TrEO e KET, foram avaliadas as combinações nas proporções de concentração 1:120; 1:60 e 1:30 (µg/mL de TrEO e µg/ mL de KET). A combinação de 1:60 apresentou efeito sinérgicos na DL₅₀, reduzindo a concentração do TrEO e KET em 50% e 88% respectivamente, além de permitir a viabilidade de mais de 58% das células peritoneais murinas. Já as combinações de 1:120 e 1:30 foram aditivas, com viabilidade celular inferior a 50%. As interações entre TrEO e AmB, foram avaliadas nas proporções de 1:1,2; 1:0,6 e 1:0,3. Ambas combinações de 1:0,6 e 1:0,3 apresentaram efeito moderadamente sinérgico na DL₅₀, reduzindo a dose de AmB e TrEO em até 87% e 60% respectivamente. Já a combinação de 1:1,2 foi antagônica. Esses resultados sugerem que tanto combinação do óleo essencial de *Tetradenia riparia* com Cetoconazol como com anfotericina B podem ser uma alternativa de tratamento para a leishmaniose tegumentar americana, porém estudos em amastigotas e em *in vivo* devem ser conduzidos para de confirmar essa possibilidade.

Palavras-chave: Leishmaniose, *checkerboard*, *Tetradenia riparia*, cetoconazol, anfotericina B, produto natural.

Anti-*Leishmania* activity of essential oil of *Tetradenia riparia* associated with ketoconazole or amphotericin B, in vitro

ABSTRACT

The objective of this work was to evaluate the interaction of the essential oil of *Tetradenia riparia* (TrEO) and ketoconazole (KET) or amphotericin B (AmB) in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes, and murine peritoneal cells to propose an alternative therapy for leishmaniasis. For this, the parasites and the murine peritoneal cells were exposed to different concentrations of TrEO, KET and AmB individually and combined using the micro-dilution checkerboard technique and the XTT colorimetric method. We analyzed the data according to the Chou-Talalay combination index method, using CompuSyn software, calculating lethal dose for 50% of parasites (LD₅₀) and cytotoxicity for 50% of murine peritoneal cells (CC₅₀) for individual and combined tests, besides to the interaction parameters as combination index (CI), dose-reduction index (DRI). The results obtained yielded two manuscripts: "Anti-*Leishmania* activity of the essential oil association of *Tetradenia riparia* and ketoconazole" and "Interactions between the essential oil of *Tetradenia riparia* and amphotericin B in *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes". The LD₅₀ for TrEO, KET and AmB tested individually after 24 hours of incubation was 0.34; 0.70 and 0.54 µg / mL respectively, and the CC₅₀ was 0.125; 40 and 10.36 µg / mL, respectively. In the interaction between TrEO and KET, were evaluated as combinations of 1:120; 1:60 and 1:30 (µg / mL TrEO / µg / mL KET). The combination of 1:60 showed to be synergistic, reducing the LD₅₀ of TrEO and KET in 50% and 88% respectively, besides allowing the viability of more than 58% of the murine peritoneal cells; the combinations of 1:20 and 1:30 were additive, but cell viabilities were less than 50%. In the interactions between TrEO and AmB, we evaluated the ratios of 1:1.2; 1:0.6 and 1:0.3. We found an effect moderately synergistic in the interaction ratio of 1:0.6 and 1:0.3, reducing the dose of AmB and TrEO by up to 87% and 60%, respectively, although in the combination of 1:1.2 their effects were antagonistic. These results suggest that the combination of *Tetradenia riparia* essential oil and ketoconazole or amphotericin B may be an alternative treatment for American tegumentary leishmaniasis, but amastigote and in vivo studies should be conducted to confirm this possibility.

Key words: Leishmaniasis, checkerboard, *Tetradenia riparia*, ketoconazole, amphotericin B

Dissertação elaborada e formatada conforme as normas da ABNT (Capítulo I) e das publicações científicas (Capítulo II): *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* (manuscrito 1) disponível em: <<http://aac.asm.org/site/misc/ifora.xhtm>> e *Journal of Antimicrobial Chemotherapy* (manuscrito 2) disponível em: <https://academic.oup.com/jac/pages/General_Instructions>

SUMÁRIO

CAPÍTULO I	10
1.1 LEISHMANIOSES	10
1.1.1 Leishmaniose tegumentar americana	11
1.1.1.1 Epidemiologia	12
1.1.1.2 Parasito	12
1.1.1.3 Vetores e Reservatórios.....	13
1.1.2 Tratamento	14
1.1.2.1 Antimoniais pentavalentes	14
1.1.2.2 Anfotericina B.....	15
1.1.2.3 Pentamidinas	15
1.1.2.4 Miltefosine	15
1.1.2.5 Cetoconazol.....	15
1.1.3 Produtos naturais	16
1.1.3.1 <i>Tetradenia riparia</i>	16
1.1.4 Terapia combinada	17
1.2 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE FÁRMACOS	18
1.2.1 Técnica de <i>checkerboard</i>	18
1.2.2 Método de Chou-Talalay	19
1.3 JUSTIFICATIVA.....	20
1.4 OBJETIVOS	21
1.4.1 Objetivo geral	21
1.4.2 Objetivos específicos	21
1.5 REFERÊNCIAS	22
CAPÍTULO II	25
2.1 MANUSCRITO 1: “Atividade anti- <i>Leishmania</i> da associação do óleo essencial de <i>Tetradenia riparia</i> e cetoconazol”	25
2.2 MANUSCRITO 2: “Interações entre o óleo essencial de <i>Tetradenia riparia</i> e anfotericina B em promastigotas de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> ”	41
CAPÍTULO III	55
3.1 CONCLUSÕES.....	55
3.2 PERSPECTIVAS FUTURAS	56

CAPÍTULO I

1.1 LEISHMANIOSES

As leishmanioses são antroponoses que representam um conjunto de doenças com grande diversidade epidemiológica e importante aspecto clínico, consideradas um grande problema de saúde pública. São causadas por protozoários de várias espécies do gênero *Leishmania*, transmitidos ao homem durante o repasto sanguíneo realizado por fêmeas de flebotomíneo (BRASIL, 2010). As primeiras espécies de *Leishmania* foram identificadas, por diferentes pesquisadores, no início do século XX e atualmente estão classificadas em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*, o primeiro encontrado apenas no novo mundo (Américas) e o segundo no novo e velho mundo (Ásia, África e Europa) (WHO, 2010).

As leishmanioses são classificadas, de acordo com as suas manifestações clínicas, como leishmaniose visceral (LV) e leishmaniose cutânea (LC), sendo determinadas pela espécie de *Leishmania* envolvida na infecção (WHO, 2010). Nas américas, a leishmaniose visceral é causada pela *Leishmania (Leishmania) infantum* e afeta órgãos como o baço, fígado, medula óssea, linfonodo, mucosa do intestino delgado, entre outros. É caracterizada por episódios irregulares de febre, perda de peso, aumento do baço e do fígado e anemia, podendo levar a morte (BRASIL, 2006; WHO, 2016)

Já a forma cutânea pode ser causada por mais de 10 espécies do parasito, sendo que no Brasil as principais são *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*. A primeira espécie, pode gerar lesões localizadas ou difusas deixando cicatrizes de longa duração e incapacidade grave. A segunda, além de acometer a pele pode também afetar as mucosas, levando à destruição parcial ou total das membranas mucosas do nariz, boca e garganta (BRASIL, 2010; WHO, 2016).

Estima-se que cerca de 200.000 a 400.000 e 0,7 a 1,3 milhões de novos casos de LV e LC, respectivamente, ocorram anualmente em todo o mundo. Sendo que, em 2014, mais de 90% dos novos casos notificados de LV ocorreram em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Em relação a LC, 95% dos casos ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central, principalmente em seis países, dentre eles o Brasil, que também está dentro dos países com mais alto índice de leishmaniose mucocutânea (WHO, 2016).

1.1.1 Leishmaniose tegumentar americana

A leishmaniose tegumentar americana (LTA), ou leishmaniose cutânea do novo mundo, é uma doença infecciosa não contagiosa, sendo primeiramente uma infecção zoonótica e envolve os homens de forma secundária (BASANO *et al*, 2004; BRASIL, 2010) . É caracterizada por um grande espectro de manifestações clínicas causadas por espécies distintas do protozoário do gênero *Leishmania* e são classificadas como leishmaniose cutânea localizada, disseminada, difusa e mucocutânea (BASANO *et al*, 2004; WHO, 2010).

A leishmaniose cutânea localizada pode ser causada por várias espécies do subgênero *Leishmania* e *Viannia*, gerando lesões em qualquer parte do corpo. Geralmente, tem início no local da inoculação com o aparecimento de uma mácula, seguida de pápulas que progridem para uma úlcera, formando uma lesão característica com borda elevada e cratera central, ou podem evoluir para uma lesão nodular. A leishmaniose cutânea disseminada tem sido relacionada ao envolvimento das espécies *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *Leishmania (Viannia) panamensis*, *Leishmania (Viannia) guyanensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e tem características semelhantes a localizada, mas aparece de forma extensa e numerosa podendo ocorrer mais de 20 e até centenas de lesões com ou sem o envolvimento da mucosa (WHO, 2010).

A leishmaniose cutânea difusa é caracterizada por mácula amplamente disseminadas na pele, nódulos ou infiltrações difusas na pele, principalmente nos membros e face e não há ulceração. Esta forma da doença não tem cura espontânea e as recidivas após o tratamento são frequentes. As principais espécie envolvidas são *Leishmania (Leishmania) mexicana* e *L.(L.) amazonensis* (WHO, 2010).

A leishmaniose mucocutânea é causada principalmente por *L. braziliensis* e *L. panamensis*, que se disseminam por via linfática ou hematogênica causando metástase para os tecidos da mucosa da boca e trato respiratório superior. Pode aparecer após alguns meses ou até mais de 20 anos depois de uma lesão cutânea. As lesões nasais são as mais frequentes e caracterizadas por nódulos e infiltrações no músculo cartilaginoso anterior ao septo, levando a obstrução da narina e posterior perfuração do septo com colapso e alargamento do nariz. (WHO, 2010).

O diagnóstico da leishmaniose tegumentar americana se constitui pela combinação entre a avaliação clínica do paciente e o conjunto de três grupos de exames: Exame parasitológico

com a demonstração direta do parasito, por meio da escarificação, biópsia com impressão por aposição ou punção aspirativa da lesão ulcerada ou nodular; exame imunológico, por meio da intradermoreação de Montenegro, baseada na visualização da resposta de hipersensibilidade tardia e os testes sorológicos como a imunofluorescência indireta (IFI) que se constitui na detecção de anticorpos anti-*Leishmania* circulantes no soro dos pacientes (BRASIL, 2010).

1.1.1.1 Epidemiologia

A leishmaniose tegumentar é considerada um problema de saúde pública em 88 países, distribuído em 4 continentes (América, Europa, Ásia e África) (BRASIL, 2010). Entre os países com notificações da doença nas Américas, o Brasil, a Colômbia e o Peru se destacaram, no ano de 2014, como países com alta carga de leishmaniose cutânea, sendo que 52,8% dos casos ocorreram no Brasil (WHO, 2016b). De acordo com a Organização Mundial de Saúde, no ano de 2013, a incidência da doença no Brasil foi de 1,46 casos/10.000 habitantes e 70% da população brasileira estava em risco de contrair a LTA.

No Brasil é considerada uma das doenças dermatológicas que merecem maior atenção, devido a sua magnitude e impacto nos âmbitos sociais e psicológicos, além de estar amplamente distribuída pelo país (BRASIL, 2010). De acordo com os dados do ministério da saúde, entre os anos de 2011 e 2015 foram notificados mais de 20 mil casos de leishmaniose tegumentar no Brasil. Nesses anos, dentre os casos notificados na região sul do país, cerca de 96% ocorreram no estado do Paraná. As principais espécies de *Leishmania* envolvidas na LTA nesse país são *Leishmania (L.) amazonensis*, *Leishmania (V.) braziliensis* e *Leishmania (V.) guyanensis* (BRASIL, 2010).

A doença tem prevalência em ambos os sexos e em todas as idades, entretanto se mostra predominante entre homens e acima dos 10 anos de idade. Foi inicialmente considerada uma doença ocupacional afetando homens expostos a área florestal, entretanto o vetor vem se adaptando durante as últimas décadas, atingindo áreas peridomiciliares, rurais e urbanizadas, afetando assim mulheres e crianças (BRASIL, 2010; ALVES e RIBAS-SILVA, 2013; NASSIF *et al.*, 2016).

1.1.1.2 Parasito

Os parasitos do gênero *Leishmania* são protozoários da família Trypanosomatidae. Apresentam-se em duas formas principais: a flagelada ou promastigota que é encontrada no

tubo digestório do inseto vetor e a forma aflagelada, também conhecida como amastigota, que é intracelular obrigatória e parasita das células fagocitárias mononucleares de hospedeiros vertebrados (BRASIL, 2010).

As promastigotas se multiplicam no sistema digestório do vetor por divisão simples e assexuada. Após aproximadamente quatro ou cinco dias migram para a proboscíde do inseto, de onde podem ser inoculadas na pele do hospedeiro vertebrado, junto com a saliva (BASANO, 2004). Após inoculada no hospedeiro, as promastigotas infectam as células fagocitárias, alojando-se nos fagossomos dos monócitos, histiócitos e macrófagos. Dentro das células, diferenciam-se em forma amastigota e se multiplicam até a romperem, disseminando-se pela via hematogênica e linfática (LAINSON, 1992). Dessa forma, iniciam uma reação inflamatória, proporcionando a atração de outros macrófagos, que são infectados, gerando um ciclo vicioso (RASO, 1994).

1.1.1.3 Vetores e Reservatórios

Os vetores da LTA são insetos flebotomíneos do gênero *Lutzomya*, conhecidos popularmente como mosquito palha, birigui, tatuquira, entre outros. No Brasil, as principais espécies do inseto envolvidas na transmissão da doença são: *Lutzomyia flaviscutellata*, *L. whitmani*, *L. umbratilis*, *L. intermedia*, *L. wellcome* e *L. migonei* (BRASIL, 2010).

Esses insetos geralmente não ultrapassam 0,5 cm de comprimento, possuem coloração parda (palha), e apenas as fêmeas possuem o aparelho bucal adaptado para picar a pele de vertebrados e sugar o sangue (REBÊLO, 1999). Portanto, são as fêmeas que transmitem o parasito mantendo assim o ciclo de transmissão (WHO, 2010). Os flebotomíneos podem ser encontrados em diferentes ambientes, altitudes e condições climáticas (MIRANDA E DIAS, 2011), sendo que seus criadouros são locais úmidos com acúmulo de matéria orgânica em decomposição (REBÊLO, 1999).

Os reservatórios dos parasitos envolvidos na doença podem ser animais silvestres, sinantrópicos e domésticos (canídeos, felídeos e equídeos). Dentre os animais silvestres, já foram registrados como hospedeiros e possíveis reservatórios naturais algumas espécies de roedores, marsupiais, edentados e canídeos silvestres. Em relação aos animais domésticos, há numerosos registros de animais infectados, entretanto o seu papel como reservatório das espécies de *Leishmania* ainda não é bem estabelecido, sendo considerados hospedeiros acidentais (BRASIL, 2010).

1.1.2 Tratamento

Há mais de sete décadas, em todo o mundo, o tratamento de primeira escolha para a leishmaniose é baseado no uso de antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de N-metil glucamina-(Glucantime®) e estibogluconato de sódio-pentostan (LIMA et al., 2007). Nos casos mais graves, de indivíduos que não respondem ao tratamento com os antimoniais, ou quando há contraindicação, são administrados os medicamentos de segunda escolha como a Anfotericina B, pentamidinas, entre outros (BRASIL, 2010; WHO, 2010). Todas essas drogas possuem uma alta toxicidade, além de falhas terapêuticas e administração parenteral, o que leva muitos pacientes à desistirem do tratamento (GOTO E LINDOSO, 2010; MURRAY *et al.*, 2005; SEIFERT E CROFT, 2006). Outros esquemas terapêuticos como a combinação de medicamentos e utilização de fármacos já eficazes para outras doenças tem sido estudadas a fim de melhorar o tratamento da leishmaniose (WHO, 2010; AL-MUTAIRI *et al.*, 2009; EL-SAYED *et al.*, 2010; SHAKYA *et al.*, 2011). Além disso, as plantas medicinais têm sido estudadas para o tratamento da doença, apresentando vantagens como menor custo e baixa toxicidade (SEN E CHATTERJEE, 2011).

1.1.2.1 Antimoniais pentavalentes

O mecanismo de ação dos antimoniais pentavalentes é a interferência na bioenergética das formas amastigotas de *Leishmania*, inibindo tanto a glicólise, quanto a oxidação dos ácidos graxos, o que reduz a produção de ATP e GTP. É contra indicado para o tratamento de gestantes, pois tem a capacidade de atravessar a barreira placentária causando danos ao feto. O principal efeito colateral é sobre o sistema cardiovascular, sendo que o paciente deve ser semanalmente monitorado, além de apresentar nefro e hepatotoxicidade (BRASIL, 2010).

A OMS recomenda que a dose nas formas cutâneas localizadas e disseminadas deva ser de 10 a 20 mg/SbV/kg/dia para adultos e crianças, por 20 dias. Se não houver cicatrização completa após três meses do início do tratamento, o esquema terapêutico deve ser repetido, e a duração da série passa a ser de 30 dias. Já na forma difusa a dose é de 20 mg/SbV/kg/dia durante 20 dias consecutivos. Em todas as formas com acometimento mucoso a dose deve ser de 20 mg/SbV/kg/dia por 30 dias e caso não haja cicatrização completa até três meses após o término do tratamento, o esquema deve ser repetido apenas mais uma vez. Os pacientes que não responderem ao tratamento deverão utilizar uma das drogas de segunda escolha.

1.1.2.2 Anfotericina B

É utilizada como primeira escolha no tratamento de gestantes e de segunda escolha quando não se tem uma resposta satisfatória com os antimonias pentavalentes ou em contra-indicações. É administrada na dose de 1 mg/kg/dia por infusão intravenosa (BRASIL, 2010). Atua na membrana citoplasmática do parasito, interferindo nos esteróis presentes na membrana, levando a formação de poros aquosos e canais de cátions (SEIFERT, 2011). Entretanto, apresenta como desvantagens de seu uso um risco a nefrotoxicidade e a necessidade de hospitalização para infusão intravenosa lenta (GRIENSVEN *et al.*, 2010).

1.1.2.3 Pentamidinas

As pentamidinas são utilizadas como segunda escolha para o tratamento da LTA em áreas endêmicas dos continentes americano, asiático e africano, com dose recomendada de 4 mg/kg/dia por via intramuscular profunda, a cada dois dias (BRASIL, 2010). São diaminas aromáticas com provável ação na mitocôndria dos parasitos, porém seu principal problema de segurança é a indução de diabetes mellitus insulino-dependente. Por esse motivo, o seu uso no tratamento da leishmaniose visceral foi suspenso na Índia (SEIFERT, 2011).

1.1.2.4 Miltefosine

É uma alquilfosfocolina, originalmente desenvolvida como droga anticancerígena, possui como provável mecanismo de ação anti-*Leishmania* alterações no seu metabolismo bioquímico (SEIFERT, 2011). Possui a vantagem de ser administrado por via oral, porém apresenta efeitos colaterais como alterações gastrointestinais, nefrotoxicidade, hepatotoxicidade, além de ser contra-indicado para gestantes devido ao risco de teratogenicidade (GRIENSVEN *et al.*, 2010).

1.1.2.5 Cetoconazol

O cetoconazol é um antifúngico azólico que tem como ação a inibição da enzima 14 α -demitilase, chave na síntese do ergosterol da membrana do parasito (LIMA *et al.*, 2007). Possui a vantagem de ser administrado por via oral. A eficácia desse fármaco no tratamento da leishmaniose, em humanos, foi relatada com a administração de 600 mg/dia (EL-SAYED, 2010; RAMANATHAN *et al.*, 2011). Entretanto, o seu uso está associado ao risco de toxicidade hepática (ANVISA, 2013).

1.1.3 Produtos naturais

As substâncias derivadas de plantas estão ganhando importância na pesquisa de novas alternativas para o tratamento da leishmaniose (SEM E CHATTERJEE, 2011). Uma revisão conduzida por Sen e Chatterjee (2011) mostrou que diversas plantas possuem substâncias com importante ação anti-*Leishmania*, sendo estudados principalmente isolados como chalconas, flavonoides, quinonas e saponinas.

Os óleos essenciais, que são misturas complexas de metabólitos secundários isolados das plantas, também apresentam atividades anti-*Leishmania* (ANDRADE-NETO *et al.*, 2012; CARDOSO *et al.*, 2015; DEMARCHI *et al.*, 2015a, 2016). Geralmente são constituídos pela mistura de 10 a 60 substâncias, em que frequentemente dois ou três dentre essas determinam suas propriedades biológicas (BAKKALI, 2008). Os óleos essenciais e suas substâncias apresentam um amplo espectro e são utilizados como analgésicos, anti-inflamatórios e antiespasmódicos, além de sedativos e antimicrobianos, antiprotozoários e anti-helmínticos (AZEREDO *et al.*, 2014; SINGH *et al.*, 2007; VICTORIA *et al.*, 2012).

1.1.3.1 *Tetradenia riparia*

A *Tetradenia riparia* (Hochstetter) Codd pertence à família *Lamiaceae*, é conhecida popularmente como falsa mirra, e utilizada no continente africano para o tratamento de doenças infecciosas e inflamatórias. A planta pode ser encontrada em toda a África Tropical e em outros lugares do mundo como China, Índia e Brasil (VAN PUYVELDE *et al.*, 1986). No Brasil, a *Tetradenia riparia* é mais utilizada como planta ornamental e incenso (GONÇALVES *et al.*, 2009).

O óleo essencial da *Tetradenia riparia* (TrEO) é constituído por uma mistura de substâncias. Dentre essas, são majoritariamente encontrados os terpenóides, sendo estes monoterpenos (hidrocarbonetos ou oxigenados), sesquiterpenos (hidrocarbonetos ou oxigenados) e diterpenos (hidrocarbonetos ou oxigenados) (WEAVER *et al.*, 1994). A análise por meio da técnica de Cromatografia Gasosa acoplada à Espectrometria de Massas (GC-MS) identificou 35 componentes. Os principais constituintes encontrados no óleo foram: α -terpineol (22,6%), Fenchona (13,6%), álcool β -fencílico (10,7%), β -cariofileno (7,9%) e álcool perilílico (6,0%)(CAMPBELL *et al.*, 1997). Apesar de alguns estudos demonstrarem que o comportamento sazonal do óleo, na sua constituição química bem como sua ação antimicrobiana se alteram de acordo com as estações do ano (CARDOSO *et al.*, 2015; GAZIM

et al., 2010), estudo conduzido por Cardoso *et al.* (2015) demonstrou que o TrEO apresenta atividade anti-*Leishmania* durante todas as estações do ano, entretanto o óleo extraído do verão apresentou uma menor citotoxicidade em células murinas. O óleo extraído do verão além de apresentar atividade leishmanicida, possui ação moduladora de mediadores imunológicos importantes envolvidos na resolução da doença (DEMARCHI *et al.* 2015; DEMARCHI *et al.*, 2015b; DEMARCHI *et al.*, 2016).

Além da atividade anti-*Leishmania*, o TrEO apresenta diversas atividades biológicas, como ação antimicrobiana (LEHMAN *et al.*, 2007); antimalárica (CAMPBELL *et al.*, 1997), tripanomicida (TORQUILHO, 2001), entre outras.

1.1.4 Terapia combinada

Um dos grandes desafios encontrados no tratamento da leishmaniose, além da toxicidade já mencionada, é o surgimento da resistência medicamentosa, que leva a falha terapêutica. A resistência medicamentosa secundária apresentada principalmente pelos antimoniais pentavalentes, pode estar vinculada a fatores relacionados ao hospedeiro como baixa adesão ao tratamento. Isso ocorre devido a toxicidade do fármaco, administração por via parenteral, pobreza e local de residência. Outro fatores que levam a resistência é a imunodepressão (HIV), além de fatores vinculados ao parasito como a carga parasitária e variação da sensibilidade espécie-específica da *Leishmania* ao fármaco.

A associação de fármacos com diferentes mecanismos de ação já é utilizada para evitar a resistência em infecções no tratamento de doenças bacterianas, hanseníase, malária e HIV. Esse tipo de terapia tem se mostrado uma tendência atual, visando principalmente aumentar a eficácia do tratamento (LIMA *et al.*, 2007). Estudos *in vitro* e *in vivo* têm mostrado que fármacos anti-*Leishmania*, que já são utilizados no tratamento da doença, quando combinados entre si ou a substâncias originadas de produtos naturais apresentaram eficácia no tratamento da leishmaniose. Demonstraram ainda, que essas associações foram capazes de diminuir a dose necessária do medicamentos, o tempo de administração e conseqüentemente a toxicidade e o custo, podendo contribuir para melhorar a adesão ao tratamento e diminuir os casos de falhas terapêuticas (AL-MUTAIRI *et al.*, 2009; CORRAL *et al.*, 2014; EL-SAYED; ANWAR, 2010; MORAIS-TEIXEIRA *et al.*, 2015; SHAKYA *et al.*, 2011)

1.2 MÉTODOS DE AVALIAÇÃO DA INTERAÇÃO DE FÁRMACOS

Diferentes modelos de estudo são utilizados para avaliar as interações entre os fármacos, dentre esses, o mais conhecido e mais simples é a técnica de *checkerboard* ou “tabuleiro de damas”. Essa técnica permite avaliar a combinação de diferentes concentrações dos fármacos diluídos de forma seriada (ODDS, 2003). A partir dos resultados encontrados com essa técnica é possível calcular parâmetros que indicam se as interações foram sinérgicas, aditivas/indiferentes e antagônicas. O parâmetro mais utilizados na literatura, para avaliar as interações entre fármacos é o Índice de Combinação Inibitória Fracionária (FICI) seguido pelo Índice de combinação de Chou-Talalay (CI) (ODDS, 2003; GRECO et al., 1995). O primeiro, utiliza as concentrações inibitórias mínimas encontradas na terapia individual e combinada, enquanto que o segundo além da concentração leva em consideração também o comportamento da curva de dose-efeito que cada fármaco possui (CHOU, 2006).

O sinergismo, assim como o efeito aditivo da combinação de fármacos têm como vantagem aumentar ou manter eficácia do efeito terapêutico com a redução da dosagem do fármaco, minimizando dessa forma a toxicidade e o desenvolvimento de resistência aos fármacos. Já o efeito antagônico indica que a ação dos fármacos se anulam, ou são reduzidas quando combinados, e portanto sua associação não é favorável, quando se pretende um tratamento que tenha uma maior eficácia do que quando utilizado de forma individual (CHOU 2010).

1.2.1 Técnica de *checkerboard*

O termo *checkerboard* refere-se ao padrão de diluição dos fármacos distribuídos na placa de microtitulação, de forma semelhante a um tabuleiro de xadrez. Na vertical, cada poço contém uma concentração de um dos fármacos diluída de forma decrescente (poços de A-H) (Figura 1), já na horizontal, um segundo fármaco é adicionado e diluído de forma decrescente da direita para a esquerda da placa (poços de 11-2) (DOUGHERTY, 1977) (Figura 1). Dessa forma, ao final, cada poço da placa possui uma combinação com concentrações diferentes de cada fármaco em um mesmo volume final. Para alcançar a concentração desejada, cada fármaco deve ser preparado em concentração inicial 4x maior.

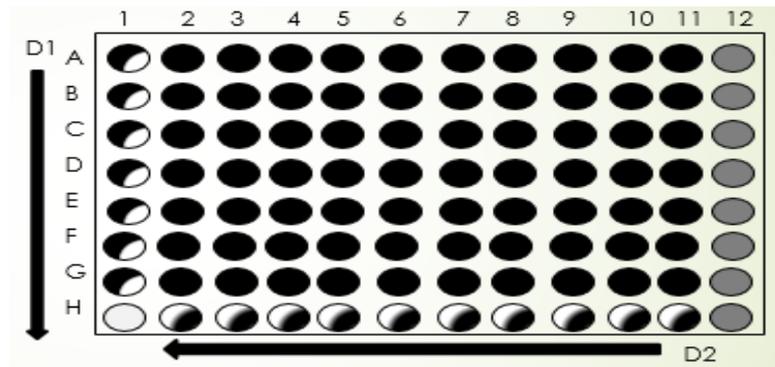


Figura 1. Layout de micro titulação. ● Droga de teste 1; ◐ Droga de teste 2; ● droga 1 + droga 2; ◑ Controle de viabilidade dos parasitos; ○ Branco da reação. D1: direção de diluição da droga de teste 1; D2: direção da diluição da droga de teste 2.

1.2.2 Método de Chou-Talallay

O método de Chou-Talallay tem sido o mais influente para avaliar as interações entre agentes, e a generalização de seu uso pode estar associada a disponibilidade de um software que realiza a interpretação dos dados (GRECO et al, 1995). É um método baseado na equação de Efeito Mediano, utilizando os parâmetros de forma da curva dada pela ação dos fármacos (m), potência (D_m) e o coeficiente linear (r) para gerar os valores índice de dose-redução (DRI) de índice de combinação (CI) (Chou, 2006) (Fig. 2). O software fornece um valor quantitativo de CI que permite definir a intensidade da interação, sendo que valores de $CI < 0,9$ indicam diferentes intensidades de sinergismo, CI entre $0,9$ e $1,10$ indicam um efeito aproximadamente aditivo e valores de $CI > 1,10$ indicam diferentes intensidades de antagonismo (Figura 3). Além disso, o software também estima os valores referentes ao efeito da dose para morte ou inibição de 50%, 75% 90% e 95% ($ED_{(x)}$) com os fármacos em combinação e a dose letal ou inibitória para 50% dos microrganismos quando o fármaco é testado individualmente ou em combinação (D_m) (Chou, 2006).

Algorithms for Computerized Simulation of Synergism, Additivism and Antagonism of the Effect of Multiple Drugs

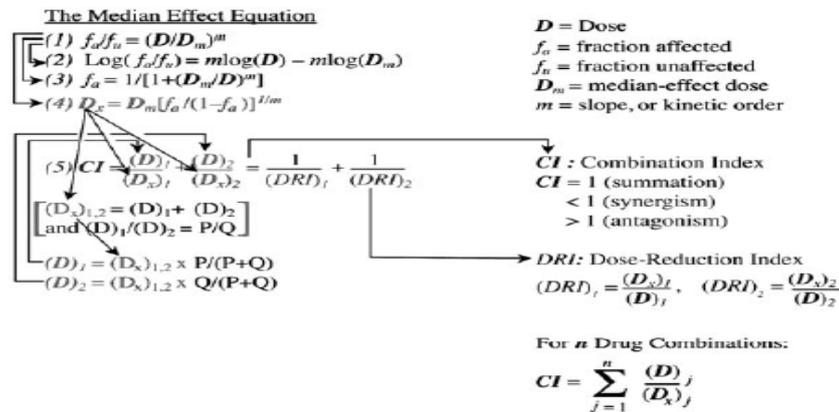


Figura 2. Demonstração da derivação da equação de efeito mediano para obtenção dos parâmetros de Índice de combinação e Índice de Dose-redução (CHOU, 2006)

Range of Combination Index	Description	Graded Symbols	Graphic Symbols
<0.1	Very strong synergism	+++++	
0.1-0.3	Strong synergism	++++	
0.3-0.7	Synergism	+++	
0.7-0.85	Moderate synergism	++	
0.85-0.90	Slight synergism	+	
0.90-1.10	Nearly additive	±	
1.10-1.20	Slight antagonism	-	
1.20-1.45	Moderate antagonism	--	
1.45-3.3	Antagonism	---	
3.3-10	Strong antagonism	----	
>10	Very strong antagonism	-----	

Figura 3. Descrição e símbolos de sinergismo ou antagonismo em estudos de combinação de fármacos analisados com o método de índice de combinação (CI), baseado no método descrito por Chou-Talalay e o software CompuSyn. CI<0,90 indicam diferentes intensidade de sinergismo; CI entre 0,90 e 1,10 indicam efeito aditivo e CI>1,10 indica diferentes intensidades de antagonismo (Chou, 2006).

1.3 JUSTIFICATIVA

A anfotericina B é um medicamento já utilizado no tratamento da leishmaniose, e apesar de seu uso ser limitado pelo risco de nefrotoxicidade, apresenta uma menor taxa de falha terapêutica quando comparado aos antimoniais pentavalentes (BRASIL, 2010). Com mecanismo de ação semelhante ao da anfotericina B, o cetoconazol já se mostrou clinicamente eficaz no tratamento da leishmaniose tanto quando administrado sozinho como em combinação com outros medicamentos anti-*Leishmania*, tendo como grande vantagem sua administração oral (RAMANATHAN *et al.*, 2011; EL-SAYED *et al.*, 2010), porém, o seu uso também está

relacionado a um risco de hepatotoxicidade (ANVISA, 2013). Os desafios relacionados ao tratamento da leishmaniose, como toxicidade, falha terapêutica e abandono da terapia, levam a necessidade de buscar novas propostas de tratamento a fim de aumentar a sua eficácia, bem como a adesão do paciente.

Considerando que o óleo essencial de *Tetradenia riparia* possui atividade anti-*Leishmania in vitro*, e reduziu a carga parasitária no baço de camundongos com leishmaniose cutânea (CAROSO *et al*, 2015; DEMARCHI *et al*, 2015), novos estudos estão sendo realizados pelo nosso grupo de pesquisa utilizando a associação deste óleo com fármacos já utilizados na terapia anti-leishmaniose. Nesse sentido, estudos de interações entre fármacos podem levar a uma redução de suas doses, da resistência do parasito e do tempo de tratamento com consequente diminuição da toxicidade, podendo resultar numa proposta terapêutica promissora para o tratamento de leishmaniose tegumentar americana.

1.4 OBJETIVOS

1.4.1 Objetivo geral

Estudar o efeito da associação do óleo essencial de *Tetradenia riparia* ao cetoconazol ou a anfotericina B em *Leishmania (Leishmania) amazonensis, in vitro*.

1.4.2 Objetivos específicos

- 1) Determinar a dose letal para 50% dos parasitos, do cetoconazol, anfotericina B e do óleo essencial de *Tetradenia riparia* em promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, utilizando o a metodologia de redução do XTT;
- 2) Avaliar a citotoxicidade do óleo essencial de *Tetradenia riparia*, cetoconazol e anfotericina B em células peritoneais murinas;
- 3) Avaliar o efeito da associação do óleo essencial de *T. riparia* com o cetoconazol em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* por *checkerboard* bidimensional;
- 4) Avaliar o efeito da associação do óleo essencial de *T. riparia* com anfotericina B em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* por *checkerboard* bidimensional;
- 5) Avaliar a citotoxicidade da associação do óleo essencial de *Tetradenia riparia* ao cetoconazol frente à células peritoneais murinas;
- 6) Avaliar a citotoxicidade da associação do óleo essencial de *Tetradenia riparia* à anfotericina B frente à células peritoneais murinas;

1.5 REFERÊNCIAS

- AL-MUTAIRI, N; ALSHILTAWY, M; EL KHALAWANY, M; JOSHI, A; EASSA, B. I; MANCHANDA, Y; GOMAA, S; DARWISH, I AND RIJHWANI, M. Treatment of old world cutaneous leishmaniasis with dapsons, itraconazole, cryotherapy, and imiquimod, alone and in combination. **International Journal of Dermatology**, v. 48, n. 8, p. 862–869, 2009.
- ALVES, P. F. R.; RIBAS-SILVA, R. C. Aspectos Epidemiológicos Da Leishmaniose Tegumentar Americana Na Região Centro Ocidental Do Paraná. **Revista de Saúde e Biologia.**, v. 8, n. 1, p. 77–84, 2013.
- ANDRADE-NETO, V. V. et al. The stepwise selection for ketoconazole resistance induces upregulation of C14-demethylase (CYP51) in *Leishmania Amazonensis*. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 107, n. 3, p. 416–419, 2012.
- ANVISA, A. N. D. V. S. Cetoconazol : risco de reações hepáticas graves associadas ao uso oral do. p. 12–14, 2013.
- AZEREDO CMO, SANTOS TG, MAIA BHLNS, S. M. In vitro biological evaluation of eight different essential oils against *Trypanosoma cruzi*, with emphasis on *Cinnamomum verum* essential oil. **BMC Complementary Alternative Medicine**, v. 14, p. 309–15, 2014.
- BAKKALI, F.; IDAOMAR, M. Biological effects of essential oils – A review. v. 46, p. 446–475, 2008.
- BASANO, S. D. A. Leishmaniose tegumentar americana: histórico , epidemiologia e perspectivas de controle American cutaneous leishmaniasis. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, p. 328–337, 2004.
- CAMPBELL, W. E; GAMMON, W. D; SMITH, P; ABRAHAMS, M; PURVES, T. D. Composition and antimalarial activity in vitro of the essential oil of *Tetradenia riparia*. **Planta Medica**, v. 63, n. 3, p. 270–272, 1997.
- CARDOSO, B. M; DE MELLO, T. F. P; LOPES, S. N; DEMARCHI, I. G; LERA, D.S.L; PEDROSO, R. B; CORTEZ, D. A; GAZIM, Z. C; ARISTIDES, S. M. A; SILVEIRA, T. G .V; LONARDONI, M. V. C. Antileishmanial activity of the essential oil from *Tetradenia riparia* obtained in different seasons. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 8, p. 1024–1034, 2015.
- CORRAL, M. J; GONZÁLEZ-SÁNCHEZ, E; CUQUERELLA, M; ALUNDAET, J. M. In vitro synergistic effect of amphotericin B and allicin on *Leishmania donovani* and *L. infantum*. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 3, p. 1596–1602, 2014.
- DEMARCHI, I. G, THOMAZELLA, M. V; TERRON, M. S; LOPES, L; GAZIM, Z. C; CORTEZ, D. A. G; DONATTI, L; ARISTIDES, S. M. A; SILVEIRA, T. G. V; LONARDONI, M. V. C. Antileishmanial activity of essential oil and 6,7-dehydroroyleanone isolated from *Tetradenia riparia*. **Experimental Parasitology**, v. 157, p. 128–137, 2015a.
- DEMARCHI, I. G, TERRON, M. S; THOMAZELLA, M. V; PEDROSO, R. B; GAZIM, Z. C; CORTEZ, D. A. G; ARISTIDES, S. M. A, SILVEIRA, T. G. V; LONARDONI, M. V.C. Immunomodulatory activity of essential oil from *Tetradenia riparia* (Hochstetter) Codd in murine macrophages. **Flavour and Fragrance Journal**, v. 30, n. 6, p. 428–438, 2015b.
- DEMARCHI, I. G; TERRON, M. S; THOMAZELLA, M. V; MOTA, C. A; GAZIM, Z. C; CORTEZ, D. A. G; ARISTIDES, S. M. A, SILVEIRA, T. G. V; LONARDONI, M. V.C. et al. Antileishmanial and immunomodulatory effects of the essential oil from *Tetradenia riparia* (Hochstetter) Codd. **Parasite Immunology**, v. 38, n. 1, p. 64–77, 2016.
- DOUGHERTY, P. F.; YOTTER, D. W.; MAITHEWS, T. R. Microdilution Transfer Plate Technique for Determining in vitro Synergy of Antimicrobial Agents. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 11, n. 2, p. 225–228, 1977.

- EL-SAYED, M.; ANWAR, A. Intralesional sodium stibogluconate alone or its combination with either intramuscular sodium stibogluconate or oral ketoconazole in the treatment of localized cutaneous leishmaniasis: A comparative study. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 24, n. 3, p. 335–340, 2010.
- GAZIM, Z. C. , AMORIM, A. C. L; HOVELL, A. M. C; REZENDE. C. M; NASCIMENTO, I. A; FERREIRA, G. A AND CORTEZ, D. A. G. Seasonal variation, chemical composition, and analgesic and antimicrobial activities of the essential oil from leaves of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Cdd in suthern Brazil. **Molecules**, v. 15, n. 8, p. 5509–5524, 2010.
- GONÇALVES, M. B. et al. Histoquímica e atividade antibacteriana de folhas do incenso (*Tetradenia riparia*) Chemical and antibacterial study of *Tetradenia riparia* leaves . **Nita**, v. 14, p. 127–140, 2009.
- GOTO, H.; LINDOSO, J. A. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. **Expert Review Anti-infective Therapy**, v. 8, n. 4, p. 419–433, 2010.
- GRECO, WILLIAM R. ; BRAVO, GREGORY; PARSONS, J. C. The Search for Synergy: A Critical Review from a Response Surface Perspective. **The American Society for Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 47, n. 2, p. 13, 1995.
- GRIENSVEN, J. VAN et al. Combination therapy for visceral leishmaniasis. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 10, n. 3, p. 184–194, 2010.
- LAINSON R, S. J. A brief history of genus *Leishmania* (Protozoa: Kinetoplastida) in the Americas with particular reference to Amazonian **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science**, v. 44, p. 94–106, 1992.
- LEHMAN, A. D. et al. Insect management products from Malian traditional medicine-Establishing systematic criteria for their identification. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 110, n. 2, p. 235–249, 2007.
- LIMA, E. B; MOTTA, J. O. C; POTO, C; SAMPAIO, R. N. R. Tratamento da Leishmaniose Tegumentar Americana *. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 82, n. 2, p. 111–124, 2007.
- MINISTÉRIO, B.; VIGILÂNCIA, S. DE. **Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana**. [s.l: s.n.].
- MINISTÉRIO, B.; VIGILÂNCIA, S. DE; VIGILÂNCIA, D. DE. **Leishmaniose Visceral**. [s.l: s.n.].
- MIRANDA, J. C.; DIAS, E. S. Vetores das Leishmanioses nas Américas. In: BARRAL, A.; COSTA, J. M. L. (Ed.). . **Leishmanias e a Leishmaniose Tegumentar nas Américas**. 1. ed. Salvador: Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico e Ciencia y Tecnologia para el Desarrollo, 2011. p. 55–64.
- MORAIS-TEIXEIRA, E; AGUIAR, M. G; LIMA, B. S.S; FERREIRA, L. A. M AND RABELLO, A. Combined suboptimal schedules of topical paromomycin , meglumine antimoniate and miltefosine to treat experimental infection caused by *Leishmania (Viannia) braziliensis*. **Journal of Antimicrobial Chemotherapy**,p. 3283–3290, 2015.
- MURRAY, H. W; BERMAN, J. D; DAVIES, C. R; SARAVIA, N. G. Advances in leishmaniasis. **Lancet**, v. 366, n. 9496, p. 1561–1577, 2005.
- NASSIF, P. W; CASTILHO-PERES, M; ROSA, A. P. Z; SILVA, A. L; ARISTIDES, S. M. A; LONARDONI, M. V. C; TEIXEIRA, J. J. V AND SILVEIRA T. G. V. Clinical , laboratory , and therapeutic characteristics of American tegumentary leishmaniasis in the 15 th State Health Division , Northwest Paraná State , Southern Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 49, n. 5, p. 593–601, 2016.
- ODDS, F. C. Synergy, antagonism, and what the chequerboard puts between them. **The Journal of antimicrobial chemotherapy**, v. 52, n. June, p. 1, 2003.

- RAMANATHAN, R; TALAAT, K. R; FEDORKO, D. P; MAHANTY, S AND NASH, T. E. A species-specific approach to the use of non-antimony treatments for cutaneous leishmaniasis. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 84, n. 1, p. 109–117, 2011.
- RASO P, G. O. Leishmaniose Tegumentar Americana. In: **Bogliolo Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1994.
- REBÊLO, J. **Flebótomos vetores das leishmanioses (Manual para técnicos e profissionais de Saúde)**. São Luiz: [s.n.].
- SEIFERT, K. Structures, targets and recent approaches in anti-leishmanial drug discovery and development. **The open medicinal chemistry journal**, v. 5, p. 31–39, 2011.
- SEIFERT, K.; CROFT, S. L. In Vitro and In Vivo Interactions between Miltefosine and Other Antileishmanial Drugs. v. 50, n. 1, p. 73–79, 2006.
- SEN, R.; CHATTERJEE, M. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. **Phytomedicine**, v. 18, n. 12, p. 1056–1069, 2011.
- SHAKYA, N; SANE, S. A; VISHWAKARMA, P; BAJPAI, P; GUPTA, S. Improved treatment of visceral leishmaniasis (kala-azar) by using combination of ketoconazole, miltefosine with an immunomodulator-Picroliv. **Acta Tropica**, v. 119, n. 2–3, p. 188–193, 2011.
- SINGH G, MAURYA S, LAMPASONA MP, C. C. A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents. **Food Chemical Toxicology**, v. 45, p. 1650–61, 2007.
- TORQUILHO, H.S.; GODOY, R.L.O.; MIDON, K.; SOBRINHO, A.; LEON, L.A.; ROSAS, E.C.; HENRIQUES, M. G. M. O. Composição química, avaliação imunofarmacológica e atividade leishmanicida do óleo essencial de *Moschosma riparium* Hochst. In: **Livro de Resumos (2)**. Poços de Caldas, Minas Gerais, Brasil: 22ª Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Química, 1999.
- TORQUILHO, H. S. **Composição química, atividade antiinflamatória, tripanomicida e antineoplásica do óleo essencial de *Tetradenia riparia* Hochstetter Codd.** [s.l.] Universidade Federal Rural do Rio de Janeiro, 2001.
- VAN PUYVELDE, L. et al. Active principles of *Tetradenia riparia*. I. Antimicrobial activity of 8(14),15-sandaracopimaradiene-7,18-diol. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 17, n. 3, p. 269–275, 1986.
- VICTORIA FN, LENARDÃO EJ, SAVEGNAGO L, PERIN G, JACOB RG, ALVES D, DA SILVA WP, MOTTA AS, N. O. Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: antioxidant and antimicrobial properties. **Food Chemical Toxicology**, v. 50, p. 2668–74, 2012.
- WEAVER, D. K.; DUNKEL, F. V.; CUSKER, J. L.; VAN PUYVELDE, L. Toxicity and protectant potencial of the essential oil of *Tetradenia riparia* (Lamiales, Lamiaceae) against *Zabrotes subfasciatus* (Col., Bruchidae) infesting dried pinto beans (Fabales, Lefuminosae). **Journal of Applied Entomology**, v. 118, p. 179–196, 1994.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Control of the leishmaniasis. **World Health Organization technical report series**, n. 949, p. 22–26, 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Leishmaniasis**. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs375/en/>>.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Weekly epidemiological record Relevé épidémiologique hebdomadaire. n. 22, p. 285–296, 2016b.

CAPÍTULO II

2.1 MANUSCRITO 1: “Atividade anti-*Leishmania* da associação do óleo essencial de *Tetradenia riparia* e cetoconazol”

1 **Atividade anti-*Leishmania* da associação do óleo essencial de *Tetradenia***
2 ***riparia* e cetoconazol**

3 Mariana de Souza Terron Monich^{a,b}; Nianki M. P. Hinokuma^a; Áquila Carolina
4 F.H. R. Milaré^a; Daniele S. S. L. Lera^a; Izabel G. Demarchi^a; Thaís G. V. Silveira^a;
5 Maria Valdrinez C. Lonardoní^a.

6 ^a Universidade Estadual de Maringá, Departamento de Análises Clínicas e Biomedicina,
7 Maringá, Brasil.

8 ^b Programa de pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Estadual de Maringá,
9 Maringá, Brasil.

10 **Resumo**

11 A terapia combinada vem se destacando como alternativa para o tratamento da leishmaniose,
12 por permitir a redução das doses dos medicamentos, bem como o tempo de tratamento, e
13 consequentemente diminuindo a toxicidade e os efeitos colaterais. O óleo essencial de
14 *Tetradenia riparia* (TrEO) e o cetoconazol (KET) possuem atividades anti-*Leishmania* já
15 descrita na literatura. Diante disso, o objetivo desta pesquisa foi avaliar o efeito, *in vitro*, da
16 associação de TrEO e KET frente a *Leishmania (Leishmania.) amazonensis (LLa)*.
17 Promastigotas de *LLa* e células peritoneais murinas foram expostas a diferentes concentrações
18 de TrEO e KET puros e suas combinações, utilizando a técnica de *checkerboard*. Foram
19 escolhidas para análise combinações de três proporções de concentração: 1:120; 1:60; 1:30
20 ($\mu\text{g/mL}$ de TrEO e $\mu\text{g/mL}$ de KET). Os resultados foram analisados pelo software CompuSyn,
21 de acordo com o método de Chou-Talallay, obtendo-se os parâmetros correspondente a dose
22 letal para 50% dos parasitos (DL_{50}), índice de combinação (CI) além do índice de dose redução
23 (DRI). A combinação de TrEO e KET mostrou efeitos sinérgicos na DL_{50} na proporção de 1:60,
24 reduzindo a concentração de DL_{50} em 50% (TrEO) e 88% (KET) em comparação a sua
25 administração isoladamente. Nas proporções de 1:120 e 1:30 os efeitos foram aditivos. Uma
26 viabilidade celular maior que 58% foi observada nas proporções de 1:30 e 1:60. Estes resultados
27 sugerem que a combinações entre TrEO e KET pode ser uma opção de tratamento para a
28 leishmaniose.

29 **Palavras-chave:** Leishmaniose; *Tetradenia riparia*; cetoconazol; sinergismo; *checkerboard*.

33 1. Introdução

34 As leishmanioses são doenças infecciosas causadas por várias espécies de protozoários do
35 gênero *Leishmania* e transmitidas através da picada da fêmea de flebotomíneos (1). Possuem
36 diversas formas clínicas, que se manifestam de forma diferente, dependendo da espécie do
37 parasito e da resposta imune do hospedeiro, podendo acometer pele, mucosa e vísceras (2).
38 Dentre as manifestações clínicas da doença, a forma mais comum é a leishmaniose cutânea
39 (LC), que possui cerca de 0,7 milhão a 1,3 milhões de novos casos ao ano em todo o mundo
40 (<http://who.int/health-topics/leishmaniasis.htm>). A LC provoca lesões, principalmente úlceras,
41 em partes expostas do corpo, deixando cicatrizes de longa duração e incapacidade grave e
42 dependendo da espécie do parasito, também pode acometer mucosas orofaríngea e nasal
43 (leishmaniose mucocutânea) causando lesões desfigurantes (3). Nas Américas, um dos
44 principais agentes etiológicos da LC é a *Leishmania (Leishmania) amazonensis* responsável por
45 também causar a leishmaniose cutânea difusa (LCD), caracterizada pelo aparecimento de lesões
46 múltiplas, sendo uma das formas mais graves da doença (3).

47 Nos últimos 70 anos, o tratamento de primeira escolha para a leishmaniose é baseado nos
48 antimoniais pentavalentes, como o antimoniato de N-metil glucamina-(Glucantime®) e
49 estibogluconato de sódio (Pentostan) (4). Entretanto, além de possuírem alta toxicidade,
50 provocar diversos efeitos colaterais e falhas terapêuticas, esses fármacos tem como
51 desvantagem o uso parenteral, o que pode levar ao abandono da terapia. Os medicamentos de
52 segunda escolha como a anfotericina B (AmB) e a pentamidina, também são injetáveis e
53 apresentam toxicidade, podendo provocar graves efeitos adversos além do alto custo que
54 possuem (5). Outro medicamento mais recentemente utilizado e de administração oral é a
55 Miltefosina, porém é teratogênico, e portanto contra-indicado para mulheres em idade fértil (6,
56 7). Diante disso, há a necessidade urgente de desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes,
57 seguros e acessíveis para o tratamento da leishmaniose (8).

58 Fármacos imidazólicos como o cetoconazol, que já são utilizados para o tratamento de
59 infecções fúngicas, atuam no bloqueio da síntese do ergosterol. O cetoconazol age no citocromo
60 P450 inibindo a 14- α -demetilase, enzima chave na síntese do esterol de fungos e
61 tripanossomatídeos (9, 10). Além disso, estudos mostram que esses fármacos são eficazes em
62 inibir o crescimento de várias espécies de *Leishmania* e *Trypanosoma cruzi* e, em alguns
63 estudos clínicos em humanos, obteve-se sucesso no tratamento da leishmaniose podendo ser

64 uma boa alternativa para o tratamento da doença com a vantagem de ser administrado por via
65 oral (8, 11).

66 Outras alternativas para o tratamento da leishmaniose que vem sendo amplamente
67 estudadas são as plantas medicinais (12). A *Tetradenia riparia* (Hochstetter) Codd pertence à
68 família Lamiaceae, também conhecida popularmente como falsa mirra, e é utilizada no
69 continente africano para o tratamento de doenças infecciosas e inflamatórias (13).
70 Recentemente, trabalhos realizados pelo nosso grupo mostraram que o óleo essencial de
71 *Tetradenia riparia* (TrEO) possui atividade leishmanicida, causando alterações celulares
72 importantes no parasito, além de modular mediadores imunológicos envolvidos na resolução
73 da doença (14–17).

74 A terapia combinada vem ganhando destaque como tratamento alternativo para a
75 leishmaniose por ser eficiente, permitir a diminuição das doses dos medicamentos e
76 concomitantemente diminuir a toxicidade, tempo de tratamento, efeitos adversos, custos e até
77 mesmo evitar o desenvolvimento de resistência dos parasitos ao medicamento (8, 18–20).
78 Diante disso, o objetivo deste estudo foi avaliar a atividade anti-*Leishmania* da associação do
79 óleo essencial de *Tetradenia riparia* e cetoconazol, com a finalidade de encontrar uma nova
80 proposta para o tratamento da leishmaniose cutânea, com menor toxicidade, fácil administração
81 e possivelmente menor custo.

82 2. Materiais e Métodos

83 **2.1 Material vegetal** – As folhas de *Tetradenia riparia* foram coletadas de espécimes
84 cultivadas em Umuarama, Paraná, Brasil (23°46'22``S e 53°16'73``O, 391 m), durante o verão.
85 A planta foi identificada pela Prof.(a) Ezilda Jacomasi do Departamento de Farmácia da
86 Universidade Paranaense (UNIPAR, Umuarama, Paraná, Brasil). A certificação da espécie da
87 planta foi depositada no herbário da UNIPAR (código 2502).

88 **2.2 Óleo essencial de *Tetradenia riparia* (TrEO)**- A extração e análise do TrEO foi realizada
89 conforme descrito por Gazim et al, 2010. A extração foi feita por meio da técnica de
90 hidrodestilação utilizando o aparelho de Clevenger modificado (3h), a partir das folhas frescas
91 da planta. O óleo destilado foi filtrado e seco com sulfato de sódio anidro e armazenado a -3°C.
92 O óleo foi analisado por cromatografia gasosa em espectrometria de massa (CG-MS) utilizando
93 o sistema Agilent 5973N CG-MS, conduzido por ionização elétrica e equipado com uma coluna
94 capilar DB-5 (30 x 0,25 mm x 0,25 mm, Agilent, PA, EUA) na qual foi injetado 1 ml da amostra
95 em solução (21, 22). A temperatura inicial da coluna foi 80 °C, e gradualmente aquecida até

96 260 °C a uma taxa de 4 °C/ min. O injetor e as temperaturas da linha de transferência foram
97 mantidos em 260 °C e 280 °C, respectivamente. Utilizou-se gás hélio (1,0 mL / min) como
98 carreador. O mesmo programa de temperatura foi utilizado para cromatografia com um detector
99 de ionização de chama (GC-FID). A identificação dos compostos foi baseada em comparações
100 de seus tempos de retenção que foram obtidos utilizando n-alcenos (C7 e C25). Os seus
101 espectros de massa de impacto de elétrons foram comparados aos espectros da biblioteca Wiley
102 e literatura (21).

103 **2.3 Fármacos** – Cetoconazol (KET) (Índia) foi solubilizado a 10 mg/mL em dimetilsufóxido
104 (DMSO, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e mantido sob proteção de luz ultravioleta e a -
105 30 °C. Para os experimentos, as diluições foram realizadas em meio RPMI 1640 (Life-
106 technologies, NY, EUA) suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino inativado (SFB)
107 (Life Technologies, EUA) e não excedendo a concentração final de 5% de DMSO. Essa
108 concentração não é citotóxica e não apresenta atividade anti-*Leishmania* (23). A anfotericina B
109 (Cristália, BRASIL) foi utilizada como fármaco de referência para o controle de tratamento. As
110 diluições de anfotericina B foram realizadas diretamente em meio de cultura RPMI 1640
111 suplementado.

112 2.4 Ensaios em promastigotas

113 **2.4.1 Cultura e manutenção de *Leishmania (Leishmania) amazonensis***. Promastigotas de *L.*
114 (*L.*) *amazonensis* (MHOM / BR / 1977 / LTB0016) foram cultivadas a 25 °C em meio 199 (Life
115 Technologies, EUA), pH 7,2, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (Life
116 Technologies, EUA), 2,2 g/L de NaHCO₃, 0,063 g/L penicilina (Sigma-Aldrich Chemie) e 0,1
117 g/L sulfato de streptomomicina (Sigma Chemical Co, EUA) e mantidas por subculturas semanais.
118 Para o estudo da atividade anti-*Leishmania*, promastigotas foram mantidas a 25 °C em meio
119 RPMI 1640 (Life Technologies, EUA), pH 6,8, suplementado com 2,0 g/L de NaHCO₃, 0,063
120 g/L penicilina (Sigma-Aldrich Chemical, EUA) e 0,1 g/L de sulfato de estreptomomicina, até
121 atingirem a fase logarítmica de crescimento.

122 **2.4.2 Atividade anti-*Leishmania* de TrEO e KET**. Para determinar a dose letal para 50% dos
123 parasitos (DL₅₀) de cada substância, promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, em fase logarítmica
124 de crescimento, foram distribuídas em microplacas de cultura de 96 poços de fundo plano
125 (4x10⁶ parasitos/ 100 µL/ poço) e tratadas com TrEO nas concentrações de 2 µg/mL – 0,06
126 µg/mL, KET (500 µg/mL – 15,63 µg/mL) e AmB (75 µg/mL – 0,07 µg/mL) por 24, 48 e 72
127 horas de incubação a 25 °C. A viabilidade dos parasitos foi avaliada pelo método colorimétrico

128 de redução do XTT (2,3-bis-[2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-5-[(fenilamino) carbonil]-2H-
129 tetra-zolium hidróxido), conforme descrito por Demarchi *et al* (2015) (15). Após 3-5 h de
130 incubação à 37 °C, a absorbância foi medida por espectrofotômetro (ASYS Expert Plus, ASYS
131 Hitech GMBH, Áustria) em comprimento de onda (λ) de 450/620 nm. Três experimentos
132 independentes foram realizados.

133 **2.4.3 Avaliação do efeito anti-*Leishmania* da combinação de TrEO e KET utilizando a**
134 **técnica de *checkerboard*.** Para que TrEO e KET fossem combinados em diversas proporções
135 de concentração, seguindo a técnica de *checkerboard*, os fármacos foram distribuídos em placas
136 de 96 poços de fundo chato da seguinte forma: Primeiramente adicionou-se 200 μ L do TrEO a
137 primeira linha da placa e diluído de forma seriada na vertical das placas. Posteriormente 100
138 μ L de KET foi adicionado na última coluna da placa e também diluído de forma seriada na
139 horizontal. Em seguida, 100 μ L de promastigotas de *LLa* em fase logarítmica de crescimento
140 foram adicionadas em todos os poços (4×10^6 parasitos/100 μ L/ poço). A concentração dos
141 fármacos na microplaca foi de 1 μ g/mL a 0,01563 μ g/mL de TrEO e 120 μ g/mL a 0,23 μ g/mL
142 de KET. Foi realizada uma curva de concentração decrescente de *Leishmania* (4×10^6 *LLa* a
143 $0,5 \times 10^6$ *LLa*/ 100 μ L/poço), utilizada como controle de viabilidade dos parasitos. O volume
144 final em cada poço foi de 200 μ L. As placas foram incubadas por 24 horas a 25⁰C e reveladas
145 pelo método de XTT (15). Foram realizados três experimentos independentes.

146 O percentual de morte dos parasitos foi obtido a partir da comparação entre a absorbância do
147 controle de viabilidade dos parasitos e da absorbância dos poços em que foram adicionadas os
148 fármacos. As relações de dose-efeito foram avaliados pelo método do índice de combinação de
149 Chou-Talallay , utilizando o software CompuSyn (24, 25). Este método baseia-se no princípio
150 do efeito mediano da ação de massas, fornecendo os parâmetros relacionados aos efeitos das
151 doses, como dose de efeito mediano (Dm) dos fármacos isolados e em combinação que
152 representa a DL₅₀, além do índice de dose-redução (DRI). Esse índice indica quantas vezes a
153 dose da substância pode ser diminuída quando combinada, para se ter o mesmo efeito de quando
154 administrada sozinha. O software também fornece o índice de combinação (CI) que determina
155 de forma quantitativa qual o efeito da combinação das substâncias, sendo CI < 0,9 indica
156 diferentes intensidades de sinergismo, CI entre 0,9 e 1,10 indicam efeito aditivo e CI > 1,10
157 indicam diferentes intensidades de antagonismo (24, 25).

158 **2.5. Citotoxicidade das substâncias isoladamente e em associação em células peritoneais**
159 **murinas.** Células peritoneais foram obtidas a partir de camundongos BALB/c fêmeas com

160 idade entre 8 e 12 semanas, conforme autorizado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de
161 Animais em Experimentações da Universidade Estadual de Maringá, PR, Brasil (CEUA nº
162 3962090915). A cavidade peritoneal dos animais foi lavada com 8 mL de meio RPMI 1640, pH
163 7.6, estéril e em temperatura ambiente, em seguida o líquido obtido contendo a suspensão de
164 células foi depositado em tubos cônicos estéreis. A suspensão de células foi ajustada para 1×10^6
165 células/ml. Em seguida, 100 μL da suspensão foi distribuída em microplacas de cultura de 96
166 poços com fundo chato (SARSTEDT, Alemanha). As placas foram incubadas por 2 horas a 37
167 $^{\circ}\text{C}$, em atmosfera contendo 5% de CO_2 . Após a incubação, as células não aderidas foram
168 removidas por uma lavagem com meio RPMI 1640. Posteriormente, baseando-se nos resultados
169 da DL_{50} obtidos no experimento anterior, foi adicionado 0,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 0,0625 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de TrEO
170 e 120 $\mu\text{g}/\text{mL}$ a 3,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de cetoconazol, separadamente e parte dos poços. Em seguida, em
171 outra parte dos poços foi adicionado a combinação de TrEO e KET (de 0,25 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 0,125
172 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de TrEO + 30 a 3,75 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de KET), e as placas foram incubadas a 37 $^{\circ}\text{C}$, em 5% CO_2
173 por 24 horas. A viabilidade das células foi avaliada pelo método colorimétrico de XTT. A
174 concentração citotóxica para 50% das células (CC_{50}) foi definida como a dose que reduziu em
175 50% a sobrevivência das células comparando com as não-tratadas (controle de viabilidade)
176 (14). Foram realizados dois experimentos independentes.

177 **2.6 Análise Estatística** – Após análise descritiva dos dados, foi realizada a análise estatística
178 utilizando a análise de variância, verificando as suposições de independência, normalidade e
179 homocedasticidade dos resíduos pelo software Past 2.17c. A significância estatística das
180 diferenças entre os valores médios obtidos nos diferentes grupos foram determinados pela
181 Análise de Variância (ANOVA) seguido de *Tukey*, ou pelo teste de *Krisskal-Wallis* utilizando o
182 software BioEstat 5.0. Foi considerada significativa as diferenças com $p < 0,05$.

183 3. Resultados

184 **3.1 Atividade do óleo essencial de *Tetradenia riparia* e cetoconazol em *Leishmania (L.)***
185 ***amazonensis***– Em promastigotas de *L. (L.) amazonensis* os resultados mostraram que ambas
186 substâncias possuem atividade leishmanicida nos três tempos de incubação estudados (Tabela
187 1). Em 24h, a DL_{50} do TrEO e do cetoconazol foi de 0,34 $\mu\text{g}/\text{mL}$ e 70 $\mu\text{g}/\text{mL}$ respectivamente
188 não apresentando diferença significativa com a DL_{50} da anfotericina B (0,54 $\mu\text{g}/\text{mL}$), que foi o
189 fármaco utilizado como referência para o tratamento. Apenas o cetoconazol apresentou uma
190 diferença significativa em sua concentração entre os tempos de incubação, com uma menor
191 DL_{50} em 24 horas ($p < 0,05$).

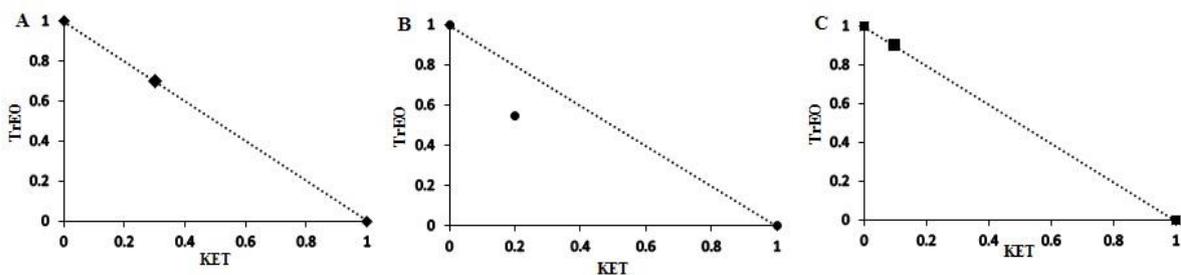
192 **Tabela 1.** Atividade em promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e citotoxicidade em
 193 células peritoneais murinas do óleo essencial de *Tetradenia riparia* (TrEO) e cetoconazol (KET) na
 194 monoterapia.^a

Fármacos	DL ₅₀ (µg/mL) ± DP			CC ₅₀ /24h (µg/mL)	
	24h	48h	72h	± DP	ITS
TrEO	0,34 ± 0,04	0,40 ± 0,05	0,30 ± 0,01	0,125 ± 0,03	0,36
KET	70 ± 11,70*	102 ± 17,60	103,50 ± 4,90	46 ± 2,64	0,65
AmB	0,54 ± 0,03	ND	ND	ND	ND

195 ^aAmB: Anfotericina B; DL₅₀: dose letal para 50% dos parasitos; CC₅₀: concentração citotóxica para
 196 50% das células murinas; ITS: Índice de seletividade terapêutica (CC₅₀/DL₅₀); DP: Desvio padrão; ND:
 197 não determinado; *diferença estatística entre os tempos de incubação $p < 0,05$.

198

199 **3.2 Determinação do efeito leishmanicida da combinação entre o TrEO e cetoconazol**
 200 **utilizando a técnica de checkerboard.** Os valores de dose de efeito mediano (Dm), obtidos
 201 pelo Software Compusyn, correspondentes a DL₅₀ dos fármacos testados individualmente,
 202 estavam na faixa de concentração previamente encontrada (0,27 µg/mL e 76 µg/mL). Para
 203 avaliar o efeito da combinação entre os dois fármacos, foram escolhidas combinações com três
 204 proporções de concentração fixas de TrEO e KET (1: 120, 1:60 e 1:30). Observou-se que
 205 todas as combinações testadas apresentaram atividade anti-*Leishmania* e a maioria promoveu
 206 um percentual de morte dos parasitos acima de 50% (Tabela 2). As três proporções de
 207 concentração testadas apresentaram interação entre os fármacos, com efeito aditivo (1:120 e
 208 1:30) e sinérgico (1:60) em suas DL₅₀ (Figura 1/ Tabela 3). Dentre essas, a proporção de 1:30
 209 foi a que apresentou um maior índice de redução de dose (DRI) para o cetoconazol (DRI=10,8).
 210 Já na proporção de 1:60, em que DL₅₀ foi de 0,15 µg/mL TrEO + 9,1 µg/mL cetoconazol, um
 211 melhor índice de combinação (CI) entre os fármacos foi observado (CI=0,66), com um DRI de
 212 1,84 e 8,4, respectivamente (Tabela 3). As relações de dose-efeito de cada combinação
 213 mostraram que as associações entre as maiores concentrações apresentaram efeitos antagônicos,
 214 e entre as concentrações menores apresentaram sinergismo e efeito aditivo.



215

216 **FIGURA 1.** Isobogramas normalizados representativos das interações de TrEO e KET na DL₅₀ das
 217 combinações de diferentes proporções de concentração A: 1:120; B:1:60; C: 1:30. As linhas cruzam o
 218 eixo X e Y nas concentrações normalizadas de DL₅₀ quando os compostos foram testados sozinhos e os
 219 símbolos representam as concentrações normalizadas das drogas testadas em combinação para atingir o
 220 mesmo efeito.

221

222 **Tabela 2.** Efeitos da combinação do óleo essencial de *Tetradenia riparia* (TrEO) e cetoconazol (KET)
 223 utilizando o método de *checkerboard*^a

Proporção de concentração TrEO-KET	TrEO (µg/mL)	KET (µg/mL)	Percentual de Morte (%)	Dm (µg/mL)
1:120	1	120	77,23 ± 19,22	
	0,5	60	74,62 ± 4,19	
	0,25	30	75,83 ± 6,91	
	0,125	15	67,78 ± 14,07	25,71
	0,0625	7,5	38,22 ± 16,16	
	0,03125	3,75	1,76 ± 6,38	
	0,01563	1,88	0,48 ± 3,81	
1:60	1	60	70,81 ± 5,22	
	0,5	30	75,41 ± 3,98	
	0,25	15	81,77 ± 6,51	
	0,125	7,5	57,72 ± 14,59	9,25
	0,0625	3,75	49,67 ± 0	
	0,03125	1,88	5,27 ± 1,43	
	0,01563	0,94	3,39 ± 5,14	
1:30	1	30	77,23 ± 7,59	
	0,5	15	74,20 ± 10,41	
	0,25	7,5	78,56 ± 7,65	6,3
	0,125	3,75	58,63 ± 5,44	
	0,0625	1,88	45,31 ± 15,96	
	0,03125	0,94	1,64 ± 5,60	

224 ^a Os fármacos foram combinados em proporções de concentração constantes (1:120;1:60 e 1:30) e seus
 225 parâmetros de dose-efeito foram analisados pelo método de Chou-Talalay utilizando o software
 226 CompuSyn (24). D_m: dose-efeito médio é a concentração da mistura dos fármacos responsável pela
 227 morte de 50% dos parasitos, obtida por meio do software a partir das médias dos percentuais de morte.
 228 A D_m para o TrEO foi de 0,27 µg/mL e de KET foi de 76 µg/mL. Os resultados dos percentuais de morte
 229 representam a média ± o desvio padrão de três experimentos independentes.

230

231 **Tabela 3.** Relação de dose-efeito nas combinações de TrEO e KET em promastigotas de *Leishmania*
 232 (*L.*) *amazonensis* ^a

Proporção de Concentração TrEO-KET	% de morte ED(n)	CI	DRI		Dose requerida (µg/mL)	
			TrEO	KET	TrEO	KET
1:120	50	1,05*	1,36	3,10	0,20	24,60
	75	1,41**	1,10	1,97	0,40	48,50
	90	1,91***	0,89	1,25	1,26	151,3
	95	2,37****	0,77	0,92	1,75	210,0
1:60	50	0,66*****	1,84	8,40	0,15	9,10
	75	1,36**	0,93	3,34	0,47	28,60
	90	2,86***	0,47	1,33	1,4	89,90
	95	4,75*****	0,29	0,71	3,2	196,0
1:30	50	0,93*	1,19	10,86	0,23	7,03
	75	1,08*	1,05	7,55	0,42	12,67
	90	1,26**	0,93	5,25	0,76	22,81
	95	1,40**	0,85	4,10	1,13	34,04

233 ^a Os fármacos foram combinadas em proporções constantes (1:120;1:60 e 1:30) seus parâmetros de
 234 dose-efeito foram analisados pelo método de Chou-Talalay utilizando o software CompuSyn (27). *
 235 efeito aditivo; **antagonismo moderado; ***efeito antagônico; ****sinergismo; ***** forte
 236 antagonismo ; ED: Dose-Efeito; DRI: Índice de Dose-Redução. Dose requerida: é a concentração
 237 necessária na mistura para obter cada efeito, estimada pelo software.

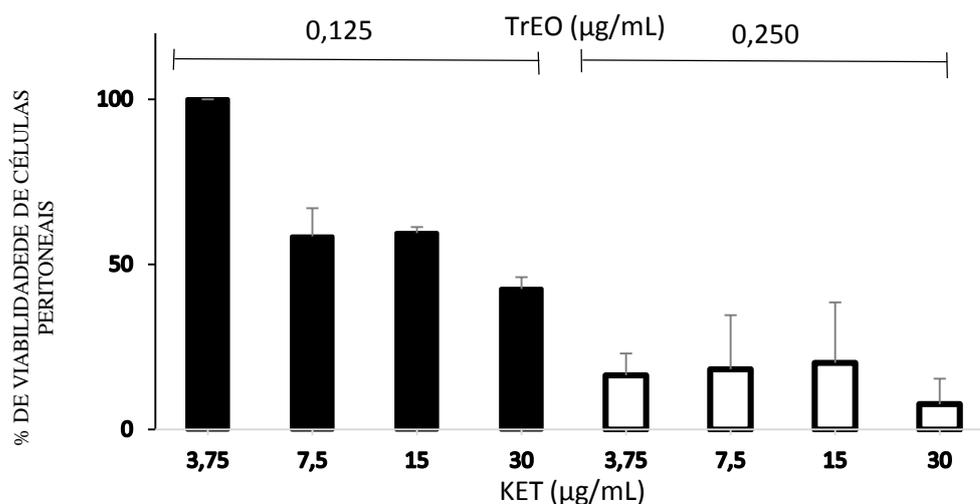
238

239 **3.4 Citotoxicidade para células peritoneais murinas.** A CC₅₀ do TrEO e KET quando
 240 testados individualmente foi de 0,125 µg/mL e de 46 µg/mL, apresentando um índice de
 241 seletividade terapêutica (IST) de 0,36 e 0,65 respectivamente (Tabela 1).

242 Os resultados da citotoxicidade da combinação de TrEO e KET, mostraram que todas as
 243 combinações utilizando 0,25 µg/mL de TrEO apresentaram uma alta citotoxicidade
 244 independentemente da concentração de KET. Já as combinações com o TrEO a 0,125 µg/mL
 245 atingiram, em sua maioria, uma viabilidade celular superior a 50% (Figura 2).

246

247



248
 249 **FIG. 2** Efeito da combinação do TrEO e cetoconazol na viabilidade de células peritoneais murinas. As
 250 frações no eixo X representam as concentrações de TrEO e cetoconazol combinadas em proporções não
 251 fixas (0,25µg/mL e 0,125 µg/mL de TrEO com 3,75 a 30 µg/mL de KET). O percentual de viabilidade
 252 é dado pela comparação entre a viabilidade do controle não-tratado e das células tratadas. Os resultados
 253 são as médias mais o erro padrão de dois experimentos independentes.
 254

255 4. Discussão

256 Um dos principais desafios relacionados a leishmaniose é o seu tratamento que
 257 apresenta, em sua maioria, falhas terapêuticas, longo tempo de tratamento e difícil
 258 administração levando a desistência, além de diversos efeitos tóxicos (27). O cetoconazol é um
 259 medicamento amplamente utilizado para o tratamento de infecções fúngicas em diversas partes
 260 do mundo, e também já se mostrou efetivo no tratamento clínico da leishmaniose quando
 261 utilizado isoladamente ou em combinação (11, 18).

262 O potencial leishmanicida óleo essencial de *Tetradenia riparia*, tem sido investigado
 263 recentemente (14, 15, 17). O óleo essencial de *Tetradenia riparia* é composto por uma mistura
 264 de terpenos (monoterpenos, diterpenos e sesquiterpenos) (14, 16, 21), com ação antimicrobiana
 265 já comprovada em diversos estudos (28–32). A atividade anti-*Leishmania* encontrada neste
 266 estudo foi semelhante aos estudos conduzidos por Demarchi *et al* (17), o que confirma o seu
 267 potencial contra o parasito e favorece a sua utilização como uma terapia alternativa e a base
 268 de produtos naturais para o tratamento da leishmaniose.

269 Outros trabalhos mostraram que o cetoconazol possui ação *in vitro* tanto em
 270 promastigotas como em amastigotas de diferentes espécies do parasito (10, 20). O estudo
 271 conduzido por Andrade-Neto e colaboradores (10), relatou que a concentração de cetoconazol
 272 responsável pela inibição de 50% de promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* foi de 2

273 μM , bem inferior a concentração responsável pela morte de 50% dos parasitos da mesma
274 espécie, encontrada neste estudo de $70 \mu\text{g/mL}$ ($137 \mu\text{M}$). Essa diferença entre as concentrações
275 pode estar relacionada a cepa do parasito, que foi diferente nos dois estudos. Por outro lado,
276 nos estudos de Shakya e colaboradores (20), que avaliou a atividade do cetoconazol em
277 amastigotas de *Leishmania donovani* a concentração do fármaco necessária para a inibição de
278 aproximadamente 40% dos parasitos intracelulares foi de $200 \mu\text{M}$, a qual se aproxima da
279 encontrada por nós contra promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*.

280 Os resultados de CC_{50} e IST encontrados para o TrEO corroboram com os achados por
281 Demarchi *et al.* (2015). Apesar dessa citotoxicidade, concentrações mais baixas do óleo, que
282 possuem uma menor atividade citotóxica, ainda apresentam ação leishmanicida em formas
283 amastigotas sugerindo que poderiam ser utilizadas para tratamentos, principalmente tópico,
284 pois a morte da célula parasitada também pode ser um alvo da terapia (14, 15, 17).

285 A combinação *in vitro* de TrEO e KET é favorável para o tratamento da leishmaniose,
286 pois apresentaram efeito aditivo e sinérgico em combinações com diferentes proporções de
287 concentração. Além disso, na proporção que apresentou efeito sinérgico (1:60) o índice de
288 redução de dose (DRI) do KET foi de 8,4 e do TrEO de 1,84 permitindo uma diminuição de
289 aproximadamente 88% e 50% na dose de cada fármaco respectivamente. Essa grande redução
290 da dose de ambos pode contribuir para minimizar os possíveis efeitos colaterais dos compostos
291 quando administrado *in vivo*, levando em consideração que um comunicado recente da gerência
292 de farmacovigilância, relacionou o uso oral do cetoconazol a um risco de toxicidade hepática
293 (<http://portal.anvisa.gov.br/informacoestecnicas13>). Ainda nessa proporção de concentração, a
294 viabilidade para as células foi superior a 58%, sendo portando uma combinação que deve ser
295 investigada em formas amastigotas de *Leishmania* e em modelos *in vivo*.

296 As análises das relações de dose-efeito mostraram que as interações entre os fármacos
297 variaram de sinérgica a aditivas dependendo das proporções de concentração de TrEO e KET.
298 Achados semelhantes a esses foram observados em um estudo que avaliou a associação entre
299 anfotericina B e allicina em *Leishmania donovani* e *L. infantum* (33), em que na combinação
300 AmB:Allicina com proporção de concentração de 0,01:5 apresentou efeitos sinérgicos, com CI
301 entre 0,49 e 0,79 e nas proporções de 0,01:10 e 0,01:20 efeitos antagônicos ou aditivos com CI
302 entre 0,99 a 1,23. Essas diferenças de interações relacionadas a proporção de concentração
303 também foram relatadas em outros estudos envolvendo combinações de fármacos contra células
304 cancerígenas (34). Isso pode estar relacionado a diversos fatores que influenciam as interações

305 entre medicamentos como mecanismo de ação, solubilidade, biodisponibilidade, entre outros
306 (35, 36).

307 Em relação as interações entre TrEO e KET, essas diferenças podem estar relacionadas
308 mecanismos de ação desses fármacos, que provavelmente possuem um alvo em comum. É
309 sabido que o alvo do cetoconazol é a membrana do protozoário, que deixa de produzir ergosterol
310 comprometendo o crescimento e divisão do protozoário (9). Apesar do mecanismo de ação do
311 TrEO ainda não ser bem conhecido, sugere-se que o seu alvo possa ser também a membrana do
312 parasito. Estudos anteriores, mostraram que o TrEO altera as ultraestruturas do parasito
313 induzindo a formação de perfis membranosos e “bleblings” de membrana que indicam a
314 apoptose do parasito (15).

315 A associação do cetoconazol e do óleo essencial de *Tetradenia riparia* possui um efeito
316 anti-*Leishmania* sinérgico e aditivo. Esses efeitos contribuem para a redução da concentração
317 da dose leishmanicida, além da diminuição do potencial citotóxico favorecendo a utilização
318 dessa terapia. Experimentos em amastigotas e em animais infectados por *Leishmania* devem
319 ser conduzidos para confirmar o pontencial dessa combinação como uma alternativa de
320 tratamento para a leishmaniose.

321 5. Agradecimentos

322 Este estudo foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento De Pessoal de Nível Superior (CAPES,
323 Brasil).

324 6. Referências

- 325 1. **Desjeux P.** 2004. Leishmaniasis: Current situation and new perspectives. *Comp*
326 *Immunol Microbiol Infect Dis* **27**:305–318.
- 327 2. **World Health Organization.** 2010. Control of the leishmaniasis. *World Health Organ*
328 *Tech Rep Ser* 22–26.
- 329 3. **Murray HW, Berman JD, Davies CR, Saravia NG.** 2005. Advances in leishmaniasis.
330 *Lancet* **366**:1561–1577.
- 331 4. **Cruz AK, de Toledo JS, Falade M, Terrão MC, Kamchonwongpaisan S, Kyle DE,**
332 **Uthaipibull C.** 2009. Current treatment and drug discovery against *Leishmania* spp. and
333 *Plasmodium* spp.: a review. *Curr Drug Targets* **10**:178–192.
- 334 5. **Goto H, Lindoso JA.** 2010. Current diagnosis and treatment of cutaneous and
335 mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther* **8**:419–433.
- 336 6. **Dorlo TPC, Balasegaram M, Beijnen JH, de Vries PJ.** 2012. Miltefosine: a review of
337 its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis. *J Antimicrob*
338 *Chemother* **67**:2576–97.

- 339 7. **Sundar S, Jha TK, Thakur CP, Engel J, Sindermann H, Fischer C, Junge K,**
340 **Bryceson A, Berman J.** 2002. Oral miltefosine for Indian visceral leishmaniasis. *N Engl*
341 *J Med* **347**:1739–1746.
- 342 8. **De Macedo-Silva ST, Visbal G, Urbina JA, De Souza W, Rodrigues JCF.** 2015.
343 Potent in vitro antiproliferative synergism of combinations of ergosterol biosynthesis
344 inhibitors against *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother* **59**:6402–
345 6418.
- 346 9. **Lepesheva GI, Waterman MR.** 2011. Sterol 14 α -Demethylase (CYP51) as a
347 Therapeutic Target for Human Trypanosomiasis and Leishmaniasis. *Curr Top Med*
348 *Chem* **11**:2060–2071.
- 349 10. **Andrade-Neto VV, de Matos-Guedes HL, Gomes DC de O, do Canto-Cavaleiro**
350 **MM, Rossi-Bergmann B, Torres-Santos EC.** 2012. The stepwise selection for
351 ketoconazole resistance induces upregulation of C14-demethylase (CYP51) in
352 *Leishmania Amazonensis*. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **107**:416–419.
- 353 11. **Ramanathan R, Talaat KR, Fedorko DP, Mahanty S, Nash TE.** 2011. A species-
354 specific approach to the use of non-antimony treatments for cutaneous leishmaniasis.
355 *Am J Trop Med Hyg* **84**:109–117.
- 356 12. **Sen R, Chatterjee M.** 2011. Plant derived therapeutics for the treatment of
357 Leishmaniasis. *Phytomedicine* **18**:1056–1069.
- 358 13. **Van Puyvelde L, Nyirankuliza S, Panebianco R, Boily Y, Geizer I, Sebikali B, De**
359 **Kimpe N, Schamp N.** 1986. Active principles of *Tetradenia riparia*. I. Antimicrobial
360 activity of 8(14),15-sandaracopimaradiene-7 α ,18-diol. *J Ethnopharmacol* **17**:269–275.
- 361 14. **Cardoso BM, De Mello TFP, Lopes SN, Demarchi IG, Lera DSL, Pedroso RB,**
362 **Cortez DA, Gazim ZC, Aristides SMA, Silveira TGV, Lonardoni MVC.** 2015.
363 Antileishmanial activity of the essential oil from *Tetradenia riparia* obtained in different
364 seasons. *Mem Inst Oswaldo Cruz* **110**:1024–1034.
- 365 15. **Demarchi IG, Thomazella MV, de Souza Terron M, Lopes L, Gazim ZC, Cortez**
366 **DAG, Donatti L, Aristides SMA, Silveira TGV, Lonardoni MVC.** 2015.
367 Antileishmanial activity of essential oil and 6,7-dehydroroyleanone isolated from
368 *Tetradenia riparia*. *Exp Parasitol* **157**:128–137.
- 369 16. **Demarchi IG, Terron M d-S, Thomazella M V., Pedroso RB, Gazim ZC, Cortez**
370 **DAG, Aristides SMA, Silveira TGV, Lonardoni MVC.** 2015. Immunomodulatory
371 activity of essential oil from *Tetradenia riparia* (Hochstetter) Codd in murine
372 macrophages. *Flavour Fragr J* **30**:428–438.
- 373 17. **Demarchi IG, Terron M de S, Thomazella MV, Mota CA, Gazim ZC, Cortez DAG,**
374 **Aristides SMA, Silveira TGV, Lonardoni MVC.** 2016. Antileishmanial and
375 immunomodulatory effects of the essential oil from *Tetradenia riparia* (Hochstetter)
376 Codd. *Parasite Immunol* **38**:64–77.
- 377 18. **El-Sayed M, Anwar A.** 2010. Intralesional sodium stibogluconate alone or its
378 combination with either intramuscular sodium stibogluconate or oral ketoconazole in the
379 treatment of localized cutaneous leishmaniasis: A comparative study. *J Eur Acad*
380 *Dermatology Venereol* **24**:335–340.
- 381 19. **Al-mutairi N, Alshiltawy M, Khalawany M El, Joshi A, Eassa BI, Manchanda Y,**

- 382 **Gomaa S, Darwish I, Rijhwani M.** 2009. Treatment of old world cutaneous
383 leishmaniasis with dapson, itraconazole, cryotherapy, and imiquimod, alone and in
384 combination. *Int J Dermatol* **48**:862–869.
- 385 20. **Shakya N, Sane SA, Vishwakarma P, Bajpai P, Gupta S.** 2011. Improved treatment
386 of visceral leishmaniasis (kala-azar) by using combination of ketoconazole, miltefosine
387 with an immunomodulator-Picroliv. *Acta Trop* **119**:188–193.
- 388 21. **Gazim ZC, Ana Carolina LA, Hovell AMC, Rezende CM, Nascimento IA, Ferreira
389 GA, Garcia Cortez DA.** 2010. Seasonal variation, chemical composition, and analgesic
390 and antimicrobial activities of the essential oil from leaves of *Tetradenia riparia*
391 (Hochst.) Cdd in suthern Brazil. *Molecules* **15**:5509–5524.
- 392 22. **Omolo MO, Okinyo D, Ndiege IO, Lwande W, Hassanali A.** 2004. Repellency of
393 essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. *Phytochemistry*
394 **65**:2797–2802.
- 395 23. **Demarchi IG, Silveira TG V, Ferreira ICP, Lonardoni MVC.** 2012. Effect of HIV
396 protease inhibitors on New World Leishmania. *Parasitol Int* **61**:538–544.
- 397 24. **Chou TC.** 2010. Drug combination studies and their synergy quantification using the
398 chou-talalay method. *Cancer Res* **70**:440–446.
- 399 25. **Chou T, Kurin E, Mučaji P, Nagy M, Hidalgo M, Sánchez-Moreno C, de Pascual-
400 Teresa S, Iacopini P, Baldi M, Storchi P, Sebastiani L, Chou T, Wang S, Wang D,
401 Liu Z.** 2010. Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity.
402 *J Food Compos Anal* **67**:621–681.
- 403 26. **Ministério B, Vigilância S De.** 2010. Manual de Vigilância da Leishmaniose
404 Tegumentar Americana.
- 405 27. **Griensven J Van, Balasegaram M, Meheus F, Alvar J, Lynen L, Boelaert M.** 2010.
406 Combination therapy for visceral leishmaniasis. *Lancet Infect Dis* **10**:184–194.
- 407 28. **Campbell WE, Gammon DW, Smith P, Abrahams M, Purves TD.** 1997.
408 Composition and antimalarial activity in vitro of the essential oil of *Tetradenia riparia*.
409 *Planta Med* **63**:270–272.
- 410 29. **Gonçalves MB, Martins RG, Alberto J, Paulo UDS.** 2009. Histoquímica e atividade
411 antibacteriana de folhas do incenso (*Tetradenia riparia*) Chemical and antibacterial
412 study of *Tetradenia riparia* leaves . *NITA* **14**:127–140.
- 413 30. **Melo NI, Carvalho CE, Fracarolli L, Cunha WR, Veneziani RCS, Martins CHG,
414 Crotti AEM.** 2015. Antimicrobial activity of the essential oil of *Tetradenia riparia*
415 (Hochst.) Codd. (Lamiaceae) against cariogenic bacteria. *Brazilian J Microbiol* **46**:519–
416 525.
- 417 31. **Length F.** 2013. Antibacterial effectiveness of *Tetradenia riparia* extract , a plant
418 traditionally used in the Eastern Cape Province to treat diseases of the respiratory system
419 **7**:2755–2760.
- 420 32. **Njau EA, Alcorn J, Buza J, Chirino-trejo M, Ndakidemi P.** 2014. Antimicrobial
421 Activity of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Lamiaceae , a Medicinal Plant from Tanzania
422 **4**:1462–1478.
- 423 33. **Corral MJ, González-Sánchez E, Cuquerella M, Alunda JM.** 2014. In Vitro

- 424 synergistic effect of amphotericin B and allicin on *Leishmania donovani* and *L. infantum*.
425 Antimicrob Agents Chemother **58**:1596–1602.
- 426 34. **Chang T, Gulati S, Chou T, Colvin M, Clarkson B.** 1987. Comparative Cytotoxicity
427 of Various Drug Combinations for Human Leukemic Cells and Normal Hematopoietic
428 Precursors 119–122.
- 429 35. **Johnson MD, Macdougall C, Ostrosky-zeichner L, Perfect JR, Rex JH.** 2004.
430 MINIREVIEW Combination Antifungal Therapy **48**.
- 431 36. **Wagner H, Ulrich-merzenich G.** 2009. Synergy research: Approaching a new
432 generation of phytopharmaceuticals **16**:97–110.

2.2 MANUSCRITO 2: “Interações entre o óleo essencial de *Tetradenia riparia* e anfotericina B em promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*”

Interações entre o óleo essencial de *Tetradenia riparia* e anfotericina B em promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Mariana de Souza Terron Monich^{a*}, Nianki M. P. Hinokuma^a, Izabel G. Demarchi^a, Zilda Cristiani Gazim^b, Thaís G. V. Silveira^a, Maria Valdrinez C. Lonardon^a

^a Universidade Estadual de Maringá, Paraná, Br

^b Universidade Paranaense, Paraná, Br

*Autor correspondente. E-mail: mariterron@hotmail.com

Endereço: Av. Colombo, 5.790 – Bloco J90, sala 03, Jd. Universitário Maringá, PR(BR)

Objetivo: Avaliar a interação *in vitro* do óleo essencial de *Tetradenia riparia* (TrEO) e anfotericina B (AmB) em *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e células peritoneais murinas.

Metodologia: A interação *in vitro* entre TrEO e AmB foi avaliada frente formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonenses (LLa)* e células peritoneais murinas, utilizando a técnica de *checkerboard*. Combinações com três proporções de concentração de AmB:TrEO foram analisadas (1:1,2; 1:0,6 e 1:0,3.). A partir do software CompuSyn foram calculadas as concentrações da dose letal para 50 % dos parasitos (DL₅₀) e citotoxicidade para 50% das células murinas (CC₅₀), assim como os parâmetros de índice de combinação (CI) e índice de dose-redução (DRI). Seguindo a metodologia de Chou-Talallay.

Resultados: A combinação de AmB:TrEO na proporção de 1:1,2 foi antagônica para *Leishmania*. Já as combinações de 1:0,6 e 1:0,3 apresentaram um efeito moderadamente sinérgico na DL₅₀ com CI de 0,73 e 0,76, respectivamente. A CC₅₀ nas combinações foram de 0,0015 mg/L na proporção de 1:1,2, de 0,0054 mg/L na proporção de 1:0,6 e de 0,0052 mg/mL na proporção de 1:0,3.

Conclusão: O estudo *in vitro* em promastigotas de *LLa* mostrou interação sinérgica entre AmB e TrEO, servindo de base para futuros estudos *in vitro* em amastigotas e *in vivo* para comprovar o potencial dessa combinação no tratamento da leishmaniose.

Palavras-Chave: leishmaniose cutânea; sinergismo; óleo essencial; *Tetradenia riparia*; anfotericina B; *checkerboard*.

INTRODUÇÃO

A leishmaniose tegumentar americana (LTA) é uma doença infecciosa, não contagiosa causada por protozoários do gênero *Leishmania* que são transmitidos para o hospedeiro durante o repasto sanguíneo realizados por insetos flebotomíneos fêmea, pertencentes a família *Lutzomia*¹. É considerada uma doença negligenciada e um problema de saúde pública em diversos países da América, Ásia, África e Europa, devido ao grau de magnitude de suas manifestações clínicas e o impacto socioeconômico gerado².

A OMS estima que 0,7 a 1,3 milhões de novos casos ocorrem anualmente em todo o mundo. Em 201, 95% dos casos ocorreram nas Américas, na bacia do Mediterrâneo, no Oriente Médio e na Ásia Central³. As principais espécies do parasito encontradas no Brasil são *Leishmania (Viannia) braziliensis* e *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, sendo essa última a responsável pela leishmaniose cutânea difusa, uma das formas mais graves da doença²

Um dos maiores desafios relacionados a doença é o seu tratamento que há mais de 70 anos é realizado utilizando antimoniais pentavalentes, como o glucantime, que além de apresentar diversos casos de falhas terapêuticas possui uma alta toxicidade com efeitos adversos que acometem principalmente o sistema cardiovascular⁴. O principal medicamento usado como segunda escolha para o tratamento é a anfotericina B (AmB), indicada nos casos de persistência da infecção e contra-indicações do antimonial. Mas, assim como os antimoniais, é de difícil administração pois depende de múltiplas injeções, além de também apresentar considerável toxicidade e diversos efeitos adversos⁵.

Por essas razões há uma grande necessidade de pesquisas que busquem formas alternativas para o tratamento da leishmaniose com efeitos menos tóxicos e mais efetivos⁶. Alguns estudos têm mostrado o efeito protetor e mais eficaz da combinação entre fármacos já utilizados para o tratamento da doença e com outras substâncias químicas ou produtos naturais. A combinação de fármacos com potencial anti-*Leishmania* pode ser uma boa alternativa, pois aumenta a eficácia do tratamento e diminui o tempo e doses necessárias dos medicamentos⁷⁻¹⁰.

O óleo essencial de *Tetradenia riparia* (TrEO) é composto por uma mistura de terpenos (monoterpenos, diterpenos e sesquiterpenos)¹¹⁻¹³ com diversas ações antimicrobianas¹⁴⁻¹⁷. A ação anti-*Leishmania* do TrEO foi recentemente observada para a espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, mostrando alto potencial do óleo em promover a morte parasitária e alterações na resposta imune de macrófagos murinos^{12,13}. No entanto, a associação de TrEO

a um medicamento preconizado para leishmaniose, como a anfotericina B, ainda não foi realizada. Sendo assim, e considerando a necessidade de novas alternativas de tratamento para a leishmaniose e as vantagens encontradas no tratamento combinado, avaliamos neste estudo a interação *in vitro* entre o óleo essencial de *Tetradenia riparia* e anfotericina B sobre promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*.

METODOLOGIA

Material vegetal. As folhas de *T. riparia* foram obtidas durante o verão de 2013, em Umuarama, Paraná, Brasil (23°46'22"S e 53°16'73"O, 391 m). A planta foi identificada pela Prof.(a) Ezilda Jacomasi do Departamento de Farmácia da Universidade Paranaense (UNIPAR, Umuarama, Paraná, Brasil). A certificação da espécie da planta foi depositada no herbário da UNIPAR (código 2502).

Óleo essencial de *Tetradenia riparia* (TrEO). A extração do TrEO foi realizada por meio de hidrodestilação utilizando um sistema de Clevenger (3h), a partir das folhas frescas da planta. O óleo destilado foi recolhido e secado em sulfato de sódio anidro e armazenado em congelador. O óleo foi analisado por cromatografia gasosa em espectrometria de massa (CG-MS) utilizando o sistema Agilent 5973N GC-MS, conduzido por ionização elétrica e equipado com uma coluna capilar DB-5 (30 m 0,25 mm 0,25 mm, Agilent, PA, EUA) na qual foi injetado 1 mL da amostra em solução^{11,18}. A temperatura inicial da coluna foi 80 °C, e gradualmente aquecida a 260 °C a uma taxa de 4°C / min. O injetor e as temperaturas da linha de transferência foram mantidos em 260°C e 280°C, respectivamente. Utilizou-se gás hélio (1,0 mL / min) como carreador. O mesmo programa de temperatura foi utilizado para cromatografia com um detector de ionização de chama (CG-FID). A identificação dos compostos foi baseada em comparações de seus tempos de retenção que foram obtidos utilizando n-alcanos (C7 e C25). Os seus espectros de massa de impacto de elétrons foram comparados aos espectros da biblioteca Wiley e literatura¹¹.

Fármaco. Anfotericina B (Cristália, BRASIL). Para os experimentos, as diluições foram realizadas em meio RPMI 1640 (Life-technologies, NY, EUA), suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (Life-technologies, NY, EUA).

Parasitas. Promastigotas de *L. (L.) amazonensis* (MHOM / BR / 1977 / LTB0016) foram cultivadas a 25°C em meio 199 (Life Technologies, EUA), pH 7,2, suplementado com 10% (v/v) de soro fetal bovino (SFB) (Life Technologies,EUA), 2,2 g/L de NaHCO₃, 0,063 g/L

penicilina (Sigma-Aldrich Chemie, EUA) e 0,1 g/L sulfato de streptomina (Sigma Chemical Co, EUA) e mantidas por subculturas semanais. Para o estudo da atividade anti-*Leishmania*, promastigotas foram mantidas a 25 °C em meio RPMI 1640 (Life Technologies, EUA), pH 6,8, suplementado com 2,0 g/L de NaHCO₃, 0,063 g/L penicilina (Sigma-Aldrich Chemical, EUA) e 0,1 g/L de sulfato de estreptomina.

Atividade em promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*. Primeiramente foram realizados testes para determinar a dose letal para 50% dos parasitos (DL₅₀) de cada substância. Para isso, promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, em fase logarítmica de crescimento, foram distribuídas em microplacas de cultura de 96 poços de fundo plano (4x10⁶ parasitos/ 100 µL/ poço) e tratadas com TrEO (0,06 mg/L- 2 mg/L), e AmB (0,07 mg/L- 75 mg/L) por 24 horas de incubação a 25 °C. A viabilidade dos parasitos foi avaliada pelo método colorimétrico de redução do XTT (2,3-bis-[2-metoxi-4-nitro-5-sulfofenil]-5-[(fenilamino) carbonil]-2H-tetrazolium hidróxido)¹³, após 3-5 h de incubação à 37 °C, a absorbância foi medida por espectrofotômetro (ASYS Expert Plus, ASYS Hitech GMBH, Áustria) em comprimento de onda (λ) de 450/620 nm. O percentual de morte dos parasitos foi obtido a partir da comparação entre a absorbância do controle de viabilidade dos parasitos e da absorbância dos poços em que foram adicionadas as drogas. Esses valores foram colocados em um gráfico de dispersão e a dose letal para 50% dos parasitos (DL₅₀) foi calculada a partir da equação da linha de tendência. Três experimentos independentes foram realizados.

Avaliação da interação, *in vitro*, do TrEO e AmB por meio do técnica *checkerboard*. Para realizar o técnica de *checkerboard* o TrEO foi diluído a 4 mg/L (0,83% de DMSO v/v) e a AmB a 4,80 mg/L em meio RPMI 1640. Em seguida, os fármacos foram distribuídos em placas de 96 poços de fundo chato, sendo primeiramente adicionado 200 µL do TrEO nos primeiros poços da primeira linha da placa e diluído de forma seriada na vertical das placas e posteriormente o 100 µL e de AmB foi adicionado na última fileira da placa e também diluído de forma seriada, porém na horizontal. Em seguida, 100 µL de promastigotas de *L.(L.) amazonensis (LLa)* em fase logarítmica de crescimento foram adicionadas (4x10⁶ parasitos/100 µL/ poço) em cada poço. A concentração atingida dos fármacos foi de 1 mg/L a 0,01563 mg/L de TrEO e 1,20 mg/L a 0,023 mg/L de AmB. Foi realizada uma curva de concentração decrescente de *Leishmania* (4x10⁶ a 0,5x10⁶ LLa/ 100 µL/poço), utilizada como controle de viabilidade dos parasitos. O volume final em cada poço foi de 200 µL. As placas foram incubadas por 24 horas a 25°C. Após o tempo de incubação, a viabilidade dos parasitos foi avaliada pelo método

colorimétrico de redução do XTT, como citado anteriormente. Foram realizados três experimentos independentes.

O percentual de morte dos parasitos foi obtido a partir da comparação entre a absorbância do controle de viabilidade dos parasitos e da absorbância tratados. As relações de dose-efeito foram avaliadas pelo método do índice de combinação de Chou-Talallay (CI), utilizando o software CompuSyn^{19,20}. Este método baseia-se no princípio do efeito mediano da ação de massas, fornecendo os parâmetros relacionados aos efeitos das doses, como a potência (Dm) dos fármacos isolados e em combinação que representa a DL₅₀, além do índice de dose-redução (DRI) que indica quantas vezes a dose da substância pode ser diminuída quando combinada, para se ter o mesmo efeito de quando administrada sozinha. O software também indica o índice de combinação (CI) que determina de forma quantitativa qual o efeito da combinação das substâncias, CI <0,90 indica diferentes intensidades de sinergismo, CI entre 0,90 e 1,10 indica efeito aditivo e CI >1,10 indica diferentes intensidades de antagonismo^{19,20}.

Citotoxicidade para células peritoneais murinas. Células peritoneais foram obtidas a partir de camundongos BALB/c fêmeas com idade entre 8 e 12 semanas, conforme autorizado pelo Comitê de Conduta Ética no Uso de Animais em Experimentações da Universidade Estadual de Maringá, PR (CEUA n^o 3962090915). A cavidade peritoneal dos animais foi lavada com 8 mL de meio RPMI 1640, pH 7,6, estéril e em temperatura ambiente. A suspensão de células foi ajustada para 1x10⁶ células/mL. Em seguida, 100 µL da suspensão foi distribuída em microplacas de cultura de 96 poços com fundo chato (SARSTEDT, Alemanha). As placas foram incubadas por 2 horas a 37^oC, em atmosfera contendo 5% de CO₂. Após a incubação, as células não aderidas foram removidas por uma lavagem com meio RPMI 1640. Em seguida, baseando-se nos resultados da DL₅₀ obtida no experimento anterior, foi realizado o tratamento com 0,5 mg/L a 0,0625 mg/L de TrEO e 62,5 mg/L a 0,15 mg/L de anfotericina B, separadamente. Também foi avaliada a combinação de TrEO e AmB nas mesmas concentrações anteriormente testadas nos parasitos, e as placas foram incubadas a 37^oC, em 5% CO₂ por 24 horas. A viabilidade das células foi avaliada pelo método colorimétrico de XTT. A concentração citotóxica para 50% das células (CC₅₀) foi definida como a dose que reduziu em 50% a sobrevivência das células comparando com as não tratadas (controle de viabilidade). Foi calculado o índice de seletividade terapêutica (ITS) pela fração CC₅₀/DL₅₀, em que ITS >1 indicam maior seletividade para o parasito¹². Foram realizados dois experimentos independentes.

RESULTADOS E DISCUSSÃO

A avaliação da atividade leishmanicida dos fármacos testados sozinhos mostrou que, após 24 horas de incubação, DL₅₀ do TrEO foi de 0,32 mg/L e da AmB de 0,52 mg/L (Tabela 1). Ambos resultados corroboram com achados anteriores pelo nosso grupo de pesquisa, em que a DL₅₀ do TrEO foi de 0,5 mg/L e da AmB foi de aproximadamente 0,5 mg/L após 24 horas de incubação¹³.

A ação anti-*Leishmania* da anfotericina B já é conhecida e considerada excelente em estudos *in vitro* tanto nas formas extracelulares como intracelulares, agindo no ergosterol de membrana do parasito². De forma semelhante, o óleo essencial de *Tetradenia riparia* parece agir também na membrana do parasito¹³ além de ter efeitos imunomodulatórios favoráveis para a resolução da infecção^{12,21}, entretanto o seu mecanismo de ação ainda não está esclarecido.

Tabela 1. Atividade do óleo essencial de *Tetradenia riparia* (TrEO) e anfotericina (AmB) em promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e em células peritoneais murinas

Fármacos	DL ₅₀ (mg/L) ± DP	CC ₅₀ (mg/L) ± DP	ITS
TrEO	0,32 ± 0,04	0,125 ± 0,03	0,39
AmB	0,54 ± 0,03	10,36 ± 1,15	19,1

AmB: Anfotericina B; TrEO: Óleo essencial de *Tetradenia riparia*; DL₅₀: dose letal para 50% dos parasitos; CC₅₀: concentração citotóxica para 50% das células murinas; ITS: Índice de seletividade terapêutica (CC₅₀/DL₅₀); DP: Desvio padrão; foram realizados dois experimentos independentes

Para avaliar a interação entre os fármacos sobre promastigotas do parasito, TrEO e AmB foram combinados utilizando o design de plaqueamento de *checkerboard*, em que é possível analisar combinações com diferentes proporções de concentração dos fármacos. Dentre as combinações, foram escolhidas para análise as com proporções de TrEO:AmB de 1:1,2, 1:0,6 e 1:0,3 (mg/L de TrEO e mg/L de AmB) que apresentaram DL₅₀ estimada pelo software CompuSyn de 0,60, 0,36 e 0,37 mg/L respectivamente (Tabela 2). A Dm correspondente a DL₅₀ dos fármacos testados individualmente ficou próximo da faixa de concentração encontrada nos testes individuais, sendo de 0,4 mg/L de TrEO e 0,7 mg/L de AmB.

Tabela 2. Efeitos da combinação do óleo essencial de *Tetradenia riparia* (TrEO) e Anfotericina B (AmB) em promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e em células peritoneais murinas.

Proporção de concentração TrEO-AmB	TrEO (mg/L)	AmB (mg/L)	Morte Parasitária (%) ± DP	Dmp (mg/L)	Morte celular (%) ± DP	Dmc (mg/L)
1:1,2	1	1,20	63,3±6,5		96,8 ±4,4	
	0,5	0,60	63,8±12,9		95,3±4,8	
	0,25	0,30	67,9±15,4		92,6±4,3	
	0,125	0,15	72,9±8,9	0,60	97,6±1,6	0,0015
	0,0625	0,075	54,1±1,1		83,4±14,7	
	0,03125	0,037	0		-	
	0,01563	0,018	0		-	
1:0,6	1	0,60	69,5±3,2		94,9±5,4	
	0,5	0,30	74,4±1,6		93,2±0,9	
	0,25	0,15	68,5±5,3		94,1±0,5	
	0,125	0,075	71,1±0,3	0,36	92,9±0,5	0,0054
	0,0625	0,037	71,3±4,3		70,9±12,6	
	0,03125	0,018	0		-	
	0,01563	0,009	0		-	
1:0,3	1	0,30	69,9±7,1		95,0±2,6	
	0,5	0,15	71,1±11,3		92,1±8,5	
	0,25	0,075	72,0±5,8		92,6±5,1	
	0,125	0,037	73,5±5,4	0,35	88,7±10,0	0,0052
	0,0625	0,018	70,2±6,6		-	
	0,03125	0,009	0		-	
	0,01563	0,0045	0		-	

Os compostos foram combinados em proporções constantes (1:1,2;1:0,6 e 1:0,3) e seus parâmetros de dose-efeito foram analisados pelo método de Chou-Talalay¹⁹ utilizando o software CompuSyn. Dm (dose-efeito médio) é a potência e significa a concentração da mistura dos compostos responsável pela morte de 50% dos parasitos (Dmp) ou 50% das células peritoneais murinas (Dmc); Os percentuais expressos são as médias de dois experimentos independentes; DP: desvio padrão.

A análise da relação de dose-efeito das combinações foi realizada por meio do software CompuSyn, e mostrou que a associação entre TrEO e AmB possui interações que variam de moderado sinergismo a antagonismo, dependendo da proporção de concentração e do percentual de morte dos parasitos (Tabela 3).

Um sinergismo moderado foi observado na DL₅₀ nas proporções de 1:0,6 e 1:0,3 com índices de combinação (CI) semelhantes entre si de 0,73 e 0,76 respectivamente. Houve também uma interação aditiva em ambas combinações na DL₇₅ com CI de 0,94 e 0,90. Em ambos os casos, o índice de dose redução (DRI) foi mais elevado para a AmB (Tabela 3). Na proporção de 1:0,3 foi possível reduzir em até 87% a concentração de AmB chegando a uma dose requerida de 0,08 µg/mL, e uma diminuição de cerca de 60% da concentração de TrEO, sendo necessários 0,27 mg/L do óleo na DL₅₀ (Fig.1/Tabela 3).

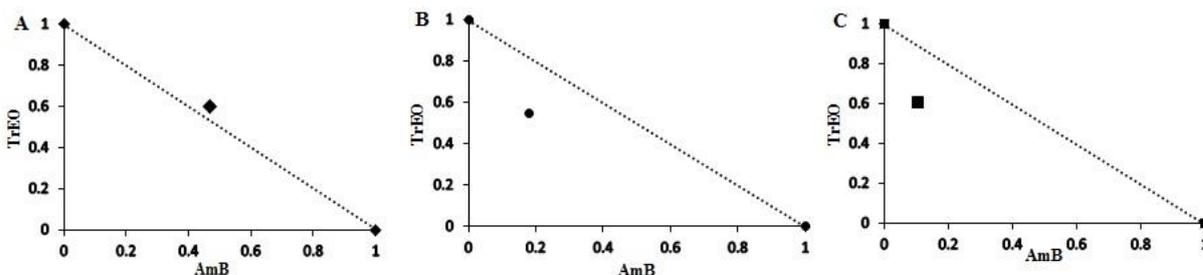


FIGURA.1 Isobogramas normalizados representativos das interações de TrEO e AmB na ED₅₀ das diferentes razões de combinação A: 1:1,2; B:1:0,6; C: 1:0,3. As linhas cruzam o eixo X e Y nas concentrações normalizadas de DL₅₀ quando os compostos foram testados sozinhos e os símbolos representam as concentrações normalizadas das drogas testadas em combinação para atingir o mesmo efeito.

Esses resultados reforçam a ideia de que um tratamento combinado entre medicamentos usuais anti-*Leishmania* e componentes de produtos naturais tem um grande potencial para serem utilizados como terapia por pacientes acometidos pela doença. Isto pode levar a um maior sucesso do tratamento, com a diminuição da dose, tempo, efeitos colaterais, além de um menor custo²². Um outro estudo que avaliou a interação entre AmB e Allicin (produto natural contituente de plantas da família Alliaceae) contra *Leishmania infantum*, mostrou uma interação semelhante a encontrada em nosso trabalho⁹. As interações variaram de sinérgicas a moderadamente antagônicas dependendo das razões de combinação e percentuais de morte,

levando a uma diminuição de até 89% da concentração de AmB na concentração inibitória de 50% dos parasitos.

Na proporção de 1:1,2 o software indicou uma interação antagônica entre os fármacos testados, assim como nas doses responsáveis pela morte de 90 e 95% dos parasitos nas duas outras combinações. Isso mostra que apesar do antagonismo, nessa proporção, a combinação entre TrEO e AmB possui boa atividade contra *Leishmania* com dose requerida baixa. Além disso, ainda observou-se uma diminuição na dose de ambos os fármacos, com DRI de 1,52 e 2,19 para TrEO e AmB na DL₅₀ (Tabela 3), que no caso do TrEO foi semelhante as outras razões, reduzindo a dose do óleo em aproximadamente 60% e da AmB em 54% (Fig.1).

Tabela 3. Relação de dose-efeito nas combinações de TrEO e AmB em promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*

Proporção de Concentração TrEO-AmB	ED(n)	CI	DRI		Dose requerida (mg/L)	
			TrEO	AmB	TrEO	AmB
1:1,2	50	1,11 ^a	1,52	2,19	0,27	0,33
	75	1,31 ^b	1,37	1,90	0,48	0,58
	90	1,47 ^c	1,16	1,63	0,84	1,01
	95	1,69 ^c	1,05	1,48	1,24	1,49
1:0,6	50	0,73 ^d	1,84	5,31	0,22	0,13
	75	0,94 ^e	1,51	4,32	0,45	0,27
	90	1,22 ^a	1,10	3,11	0,89	0,53
	95	1,46 ^b	0,92	2,59	1,42	0,85
1:0,3	50	0,76 ^d	1,53	8,84	0,27	0,08
	75	0,90 ^f	1,35	7,73	0,49	0,14
	90	1,06 ^e	1,10	6,2	0,88	0,26
	95	1,18 ^b	0,99	5,56	1,32	0,39

As drogas foram combinadas em frações constantes (1:1,2; 1:0,6 e 1: 0,3) seus parâmetros de dose-efeito foram analisados pelo método de Chou-Talalay utilizando o software CompuSyn¹⁹ DE_(n): dose-efeito (% de morte); CI: Índice de Combinação; ^a Leve antagonismo; ^b moderado antagonismo; ^c antagonismo; ^d moderado sinergismo; ^e aditivo; ^f leve sinergismo²⁰. ED: Dose-Efeito; DRI: Índice de Dose-Redução. Dose requerida: é a concentração necessária para a mistura para cada efeito, estimada pelo software.

A avaliação da citotoxicidade para células peritoneais murinas mostrou que quando testados individualmente, a CC₅₀ de TrEO foi de 0,125 mg/Le de 10,36 mg/L para a AmB, com um índice de seletividade terapêutica (IST) de 0,39 e 19,1 respectivamente. Os resultados de TrEO e AmB são semelhantes aos encontrados por Demarchi et al, 2015, e indicam que o óleo essencial de *Tetradenia riparia* possui uma alta citotoxicidade para células murinas, enquanto que a AmB aparentemente não apresentou citotoxicidade

Apesar de a AmB parecer não apresentar citotoxicidade quando testada de forma individual, sabe-se que quando administrada por via parenteral em humanos para o tratamento de leishmaniose, a anfotericina B apresenta uma alta nefrotoxicidade, sendo a insuficiência renal uma de suas mais importantes reações adversas^{2,23}. Isso sugere que nem sempre os achados *in vitro* se reproduzem *in vivo*, levando em consideração a complexidade e metabolismo de um organismo completo⁸.

Por outro lado, em outros estudos, concentrações menores de TrEO com baixa citotoxicidade ainda apresentaram atividade anti-*Leishmania* em formas amastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, indicando que o óleo tem potencial no tratamento da leishmaniose¹². Além disso, um outro estudo encontrou atividade *in vivo* em uso tópico do óleo essencial de *Tetradenia riparia* para tratar camundongos infectados com a espécie de *Leishmania (L.) amazonensis*. Este estudo sugere que o óleo possa ser utilizado de forma tópica o que poderia diminuir os possíveis riscos de efeitos colaterais relacionados a sua citotocixidade¹².

As mesmas proporções de concentração entre TrEO e AmB testadas em promastigotas de *LLa* foram avaliadas em células peritoneais murinas. Todas as concentrações testadas apresentaram uma citotoxicidade para mais de 70% das células, com uma CC₅₀ na mistura estimada pelo software de 0,0015, 0,0054 e 0,0052 mg/L nas proporções de 1:1,2, 1:0,6 e 1:0,3 respectivamente (tabela 2). O IST mostrou que a combinação dos fármacos apresentaram uma alta citotoxicidade, sendo menor que 1 nas três proporções analisadas (Tabela 4). Apesar disso, pode-se observar que o valor do IST foi maior nas proporções que apresentaram efeito sinérgico e aditivo contra promastigotas de *Leishmania*, mostrando que essas combinações além de possuírem uma boa interação contra o parasito são menos citotóxicas quando comparadas a proporção de 1:1,2 que apresentou efeito antagônico contra os parasitos.

Tabela 4. Concentração citotóxica estimada para 50% das células murinas na combinação de AmB e TrEO

Proporção de concentração TrEO-AmB	CC ₅₀ na combinação (mg/L)	Concentração individual requerida (mg/L)		IST (CC ₅₀ /DL ₅₀)
		AmB	TrEO	
1:1,2	0,0015	0,0008	0,0007	0,0026
1:0,6	0,0054	0,0020	0,0034	0,0142
1:0,3	0,0052	0,0012	0,0040	0,0162

AmB: Anfotericina B; TrEO: óleo essencial de *Tetradenia riparia*; IST: Índice de seletividade terapêutica. Os valores de concentração da mistura e concentração individual requerida foram determinados por meio do software CompuSyn.

Uma das principais vantagens dos estudos sobre interação entre fármacos e avaliar um possível sinergismo, é poder ver a capacidade de diminuir a dose de medicamentos, com consequente redução dos efeitos adversos relacionados a toxicidade, reduzir o tempo e melhorar a eficácia do tratamento²⁴. Na leishmaniose, um tratamento combinado poderia reduzir o alto índice de falha terapêutica e abandono do tratamento, uma vez que os fármacos utilizados atualmente são de difícil administração e requerem longo período de tratamento para alcançarem resultados significativos de cura^{7-9,25,26}.

A combinação entre TrEO e AmB mostrou sinergismo em baixas concentrações, possibilitando a diminuição da dose de AmB, o que sugere que a associação de ambas pode ser promissora para o tratamento da leishmaniose. Apesar de juntas apresentarem uma alta citotoxicidade *in vitro*, a proposta de tratamento para a leishmaniose tegumentar seria de associar os fármacos utilizando diferentes vias de administração, como a via parenteral para a AmB e a tópica para o TrEO. Dessa forma, poderia diminuir os efeitos adversos relacionados a essa toxicidade. Sendo assim, outros estudos que avaliem essa interação em formas amastigotas e *in vivo* devem ser conduzidos para confirmar esse potencial e seus possíveis efeitos tóxicos e de eficácia

FINANCIAMENTO

Este trabalho foi apoiado pela Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)

DECLARAÇÕES DE TRANSPARÊNCIA

Nada a declarar.

REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Control of the leishmaniasis. *World Health Organ Tech Rep Ser.* 2010; **949**:22-26.
2. Ministério B, Vigilância S De. *Manual de Vigilância Da Leishmaniose Tegumentar Americana.*; 2010.
3. Ministério da Saúde B. Portal DATASUS. <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/ltabr.def>.
4. Cruz AK, de Toledo JS, Falade M, et al. Current treatment and drug discovery against *Leishmania* spp. and *Plasmodium* spp.: a review. *Curr Drug Targets.* 2009;**10**:178-192.
5. Goto H, Lindoso JA. Current diagnosis and treatment of cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. *Expert Rev Anti Infect Ther.* 2010;**8**:419-433.
6. De Macedo-Silva ST, Visbal G, Urbina JA, De Souza W, Rodrigues JCF. Potent in vitro antiproliferative synergism of combinations of ergosterol biosynthesis inhibitors against *Leishmania amazonensis*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2015;**59**:6402-6418.
7. Seifert K, Croft SL. In Vitro and In Vivo Interactions between Miltefosine and Other Antileishmanial Drugs. 2006;**50**:73-79.
8. Seifert K, Munday J, Syeda T, Croft SL. In vitro interactions between sitamaquine and amphotericin B, sodium stibogluconate, miltefosine, paromomycin and pentamidine against *Leishmania donovani*. 2011;850-854. .
9. Corral MJ, González-Sánchez E, Cuquerella M, Alunda JM. In Vitro synergistic effect of amphotericin B and allicin on *Leishmania donovani* and *L. infantum*. *Antimicrob Agents Chemother.* 2014;**58**: 1596-1602.
10. Trinconi CT, Reima JQ, Coelho AC, Uliana SRB. Efficacy of tamoxifen and miltefosine combined therapy for cutaneous leishmaniasis in the murine model of infection with *Leishmania amazonensis*. 2016;1314-1322.
11. Gazim ZC, Ana Carolina LA, Hovell AMC, et al. Seasonal variation, chemical composition, and analgesic and antimicrobial activities of the essential oil from leaves of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Cdd in southern Brazil. *Molecules.* 2010;**15**:5509-5524.
12. Cardoso BM, De Mello TFP, Lopes SN, et al. Antileishmanial activity of the essential oil from *Tetradenia riparia* obtained in different seasons. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2015;**110**:1024-1034.
13. Demarchi IG, Thomazella MV, de Souza Terron M, et al. Antileishmanial activity of essential oil and 6,7-dehydroroleanone isolated from *Tetradenia riparia*. *Exp Parasitol.* 2015;**157**:128-137..
14. Campbell WE, Gammon DW, Smith P, Abrahams M, Purves TD. Composition and antimalarial activity in vitro of the essential oil of *Tetradenia riparia*. *Planta Med.* 1997;**63**:270-272.
15. Gonçalves MB, Martins RG, Alberto J, Paulo UDS. Histoquímica e atividade antibacteriana de folhas do incenso (*Tetradenia riparia*) Chemical and antibacterial

- study of *Tetradenia riparia* leaves . *NITA*. 2009;**14**:127-140.
16. Melo NI, Carvalho CE, Fracarolli L, et al. Antimicrobial activity of the essential oil of *Tetradenia riparia* (Hochst.) Codd. (Lamiaceae) against cariogenic bacteria. *Brazilian J Microbiol*. 2015;**46**:519-525.
 17. Lengh F. Antibacterial effectiveness of *Tetradenia riparia* extract , a plant traditionally used in the Eastern Cape Province to treat diseases of the respiratory system. 2013;**7**:2755-2760.
 18. Omolo MO, Okinyo D, Ndiege IO, Lwande W, Hassanali A. Repellency of essential oils of some Kenyan plants against *Anopheles gambiae*. *Phytochemistry*. 2004;**65**:2797-2802.
 19. Chou TC. Drug combination studies and their synergy quantification using the chou-talalay method. *Cancer Res*. 2010;**70**:440-446.
 20. Chou T. Theoretical Basis , Experimental Design , and Computerized Simulation of Synergism and Antagonism in Drug Combination Studies □. 2007.
 21. Demarchi IG, Terron M de S, Thomazella MV, et al. Antileishmanial and immunomodulatory effects of the essential oil from *Tetradenia riparia* (Hochstetter) Codd. *Parasite Immunol*. 2016;**38**:64-77..
 22. Sen R, Chatterjee M. Plant derived therapeutics for the treatment of Leishmaniasis. *Phytomedicine*. 2011;**18**:1056-1069.
 23. Gradoni L, Gramiccia M, Scalone A. Visceral Leishmaniasis Treatment, Italy. 2003;**9**:2001-2004.
 24. Chou T, Kurin E, Mučaji P, et al. Flavonoid–flavonoid interaction and its effect on their antioxidant activity. *J Food Compos Anal*. 2010;**67**:621-681.
 25. Seifert K. Structures, targets and recent approaches in anti-leishmanial drug discovery and development. *Open Med Chem J*. 2011;**5**:31-39.
 26. Omollo R, Alexander N, Edwards T, et al. Safety and Efficacy of miltefosine alone and in combination with sodium stibogluconate and liposomal amphotericin B for the treatment of primary visceral leishmaniasis in East Africa : study protocol for a randomized controlled trial. 2011:1-10.

CAPÍTULO III

3.1 CONCLUSÕES

Analisando as interações do óleo essencial de *Tetradenia riparia* com cetoconazol ou com anfotericina B em promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e em células peritoneais murinas, foi possível concluir:

- Todas as combinações entre os fármacos apresentaram atividade anti-*Leishmania*;
- Tanto a combinação entre o óleo essencial de *Tetradenia riparia* e cetoconazol como com anfotericina B, apresentou diferentes interações dependendo das proporções de combinação e percentual de morte dos parasitos;
- A interação entre TrEO e KET foi sinérgica na DL₅₀ nas proporções de 1:60 e aditiva na DL₅₀ das proporções de 1:120 e 1:30;
- O efeito sinérgico entre TrEO e KET na razão permitiu a redução de 50% e 88% nas doses dos respectivos fármacos;
- A interação entre TrEO e AmB foi sinérgica na DL₅₀ das proporções de 1:0,6 e 1:0,3 além de nessas mesmas razões apresentar efeito aditivo na DL₇₅;
- Na combinação com proporção de concentração de 1:1,2 de TrEO e AmB tiveram uma interação antagônica;
- A combinação de TrEO e KET na razão 1:60 apresentou uma menor citotoxicidade;
- Na entre TrEO e AmB as proporções de 1:0,6 e 1:0,3 apresentaram menor citotoxicidade.
- O sinergismo e efeito aditivo apresentado em ambas combinações, sugere que esses fármacos apresentam um potencial de serem utilizados em uma terapia combinada no tratamento leishmaniose.

3.2 PERSPECTIVAS FUTURAS

A terapia combinada no tratamento da leishmaniose tegumentar cutânea pode ser uma alternativa promissora, permitindo a redução da dose dos fármacos utilizados e consequentemente a toxicidade de efeitos colaterais a eles relacionados. Diante disso e dos efeitos encontrados na combinação entre o óleo essencial de *Tetradenia riparia* e cetoconazol/anfotericina B, mais estudos devem ser conduzidos utilizando formas amastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, além da avaliação destas interações em modelos *in vivo* e o estudo dos mecanismos de interação desses fármacos.