

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PERNAMBUCO
CENTRO DE BIOCIÊNCIAS - CB
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM INOVAÇÃO TERAPÊUTICA**

JOÃO SOARES BRITO DA LUZ

ANÁLISE COMPARATIVA DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO* DO ÁCIDO ÚSNICO E DO SEU DERIVADO USNATO DE POTÁSSIO ISOLADO DA *Cladonia substellata* VAINIO

RECIFE
2019

JOÃO SOARES BRITO DA LUZ

ANÁLISE COMPARATIVA DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO* DO ÁCIDO ÚSNICO E DO SEU DERIVADO USNATO DE POTÁSSIO ISOLADO DA *Cladonia substellata* VAINIO

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica do Centro de Biociências da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE), como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutor em Inovação Terapêutica.

Área de Concentração: Fármacos, Medicamentos e Insumos Essenciais para a Saúde.

Orientadora:

Prof^a Dr^a Paloma Lys de Medeiros
(Dept^o de Histologia e Embriologia-CB/UFPE)

Coorientadora:

Prof^a Dr^a Eliete Cavalcanti da Silva
(Dept^o de Histologia e Embriologia- CB/UFPE)

RECIFE
2019

Catálogo na fonte
Elaine C Barroso (CRB4/1728)

Luz, João Soares Brito da

Análise comparativa da atividade leishmanicida *in vitro* do ácido úsnico e do seu derivado usnato de potássio isolado da *Cladonia substellata* Vainio / Sandra Elizabeth Barbosa da Silva- 2019.

67 folhas: il., fig., tab.

Orientadora: Paloma Lys de Medeiros

Coorientadora: Eliete Cavalcanti da Silva

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. Programa de Pós-Graduação em Inovação Terapêutica. Recife, 2019.

Inclui referências e anexos

1. Leishmaniose 2. Ácido úsnico 3. Toxicidade I. Medeiros, Paloma Lys de (orient.) II. Silva, Eliete Cavalcanti da (coorient.) III. Título

616.9364

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2019-352

JOÃO SOARES BRITO DA LUZ

ANÁLISE COMPARATIVA DA ATIVIDADE LEISHMANICIDA *IN VITRO* DO ÁCIDO ÚSNICO E DO SEU DERIVADO USNATO DE POTÁSSIO ISOLADO DA *Cladonia substellata* VAINIO

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica da Universidade Federal de Pernambuco como parte dos requisitos para defesa da Tese de Doutorado em Inovação Terapêutica.

DATA DE APROVAÇÃO: ____/____/2019

Banca examinadora:

Prof^ª. Dr^ª. Ana Catarina Simonetti (1º EXAMINADOR)
Instituição: Centro Universitário Tabosa de Almeida (Asces-Unita)
Assinatura: _____

Prof^ª. Dr^ª. Fabiana Aparecida Cavalcante Silva (2º EXAMINADOR)
Instituição: Departamento de Genética (CB/UFPE)
Assinatura: _____

Prof^ª. Dr^ª. Dijanah Cota Machado (3º EXAMINADOR)
Instituição: Departamento de Biofísica e Radiobiologia (CB/UFPE)
Assinatura: _____

Prof. Dr. Cláudio Gabriel Rodrigues (4º EXAMINADOR)
Instituição: Departamento de Biofísica e Radiobiologia (CB/UFPE)
Assinatura: _____

Prof^ª. Dr^ª. Paloma Lys de Medeiros (Presidente)
Instituição: Departamento de Histologia e Embriologia (CB/UFPE)
Assinatura: _____

Dedico este trabalho a Deus, minha mãe e ao meu pai (in memoriam) que sempre me incentivaram e apoiaram durante toda vida.

AGRADECIMENTOS

A Deus por me dar forças, me iluminar e proteger a mim e toda minha família.

Aos meus pais, Maria Jesus e João Soares (*in memoriam*) por investirem no meu estudo. Agradeço o amor, o carinho e o apoio sempre presentes em minha vida.

A minha esposa, Alexsandra, pelo companheirismo, carinho e paciência, durante todo o tempo.

A minha filha, Maria Clara, razão da minha vida e motivo para seguir em frente.

A minha comadre, Madi Diniz por me ajudar nos momentos em que mais precisei, procurando me ajudar nas dificuldades durante a realização deste trabalho.

A minha Orientadora, Paloma Lys de Medeiros, pela paciência, sabedoria e racionalidade em tudo que faz, agradeço pelo apoio e por acreditar em mim na construção deste trabalho.

A minha Coorientadora, Eliete Cavalcanti da Silva, por me receber pelo carinho, paciência e por todos os ensinamentos.

A Erwelly Barros, por me receber no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Histologia e Embriologia (**LCT-DHE**) e por me apoiar sempre nesta caminhada.

A todos os colegas que fazem parte do Laboratório de Cultura de Tecidos (**LCT-DHE**) pelo carinho, companheirismo e cumplicidade.

Aos meus amigos, Dr. Luiz Carlos Alves e Dr. Fábio André Brayner dos Santos, pesquisadores do Instituto Aggeu Magalhães (**IAM/FIOCRUZ-PE**) e responsáveis pelo setor de Microscopia Eletrônica do Laboratório de Imunopatologia Keizo Azami (**LIKA**), pela realização das Microscopias Eletrônicas (Varredura e Transmissão).

Ao Prof. Dr. Nicácio Henrique da Silva e a Prof^ª. Dr^a. Mônica Cristina Barroso Martins, do Laboratório de Produtos Naturais da UFPE, pela confiança e pela colaboração na realização

deste projeto.

Ao doutorando Gustavo Lima, agradeço pela contribuição na extração proteica, imprescindível para a realização de parte deste estudo.

Ao Dr. Prof. Tercílio Calsa Júnior, por me receber no Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas (**LGPP**), possibilitando a realização de parte deste trabalho.

A Prof^a. Dr^a. Fabiana Aparecida Cavalcante Silva, pela colaboração, dedicação e empenho em ajudar-me na construção de parte deste trabalho.

Ao doutorando Elton Pedro Nunes Pena, sem você seria impossível a realização do estudo proteômico. Agradeço a enorme ajuda e paciência na realização dos ensaios. Obrigado por tudo!

A minha amiga e irmã, Klewdma de Freitas Araújo, pela amizade, cumplicidade e por ajudar-me sempre.

A amiga, Elizabeth Marina, do setor de Hemostasia do Hospital das Clínicas-UFPE, por me ajudar a dar continuidade a este estudo, possibilitando meu crescimento científico.

A Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica (**PPGIT**), Prof^a. Dr^a. Máira Galdino da Rocha Pitta e a todos os professores por oferecerem todo o apoio e ensinamentos para a realização desta pesquisa.

Ao Secretário do Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica (**PPGIT**), Paulo Germano, pelo suporte, atenção e compromisso com todos os alunos pertencentes ao programa.

As demais pessoas que direta ou indiretamente, contribuíram para a minha formação pessoal, acadêmica e profissional.

Obrigado!

RESUMO

A leishmaniose apresenta-se como um grave problema de saúde pública em muitos países do mundo, afetando populações social e economicamente vulneráveis. A busca por novos fitoquímicos com ação antiparasitária, menor toxicidade e de baixo custo surge como uma alternativa aos tratamentos existentes. Alguns estudos mostraram que o ácido úsnico (AU) possui diversas atividades biológicas (antiproliferativa, antiviral, anti-inflamatória, antimicrobial e antiparasitária), no entanto apresenta elevada hepatotoxicidade e baixa solubilidade. A forma solúvel do AU, sal de potássio derivado do ácido úsnico (PS-UA) ou usnato de potássio, tem sido utilizada por alguns pesquisadores no intuito de aumentar sua eficácia e reduzir sua toxicidade. No presente estudo, objetivou-se analisar a atividade leishmanicida *in vitro* do AU e do PS-UA frente às formas promastigotas de *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* e a citotoxicidade em macrófagos (RAW 264.7); assim como, avaliar se esses compostos interferem na morfologia do parasita. O AU foi isolado do extrato bruto do líquen *Cladonia substellata* Vainio e o PS-UA foi obtido a partir da salinização desse extrato. A atividade antiprotozoária do AU e do PS-UA contra formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* e a viabilidade celular foram avaliadas pelo ensaio do MTT. Análises estruturais e ultraestruturais dos parasitos foram realizadas através de microscopia eletrônica. Adicionalmente, neste estudo foi utilizada a técnica de eletroforese em gel bidimensional (2D) e espectrometria de massas (MALDI-TOF/TOF) com a finalidade de destacar e identificar proteínas diferencialmente acumuladas nas formas promastigotas dos parasitos sob ação do PS-UA (6,25 µg/mL). A IC₅₀ do AU e do PS-UA frente às formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* foram determinadas (18,30 ± 2,00 e 3,71 ± 2,99 µg/mL, respectivamente) e a concentração da IC₅₀ do PS-UA revelou ser sete vezes menos tóxica para os macrófagos (CC₅₀ = 26.31 ± 13.55 µg/mL, IS = 7). A análise dos parasitos pela microscopia eletrônica de varredura revelou alterações de superfície e de forma (conforme as concentrações de IC₅₀ determinadas). Foram observadas as seguintes alterações ultraestruturais: sob ação do AU detectou-se tumefação dos parasitos, perda de polaridade celular e aumento do número de vacúolos citoplasmáticos; já sob ação do PS-UA observou-se modificações na cromatina nuclear, intensa vacuolização citoplasmática, extensa tumefação mitocondrial, corpos lipídicos e vesículas elétron-densas por todo o citoplasma. Através da eletroforese (2D) foi observado um total de 450 *spots* proteicos e na análise comparativa dos perfis proteômicos entre as formas promastigotas tratadas com PS-UA e as formas não tratadas foram revelados 173 *spots*, sendo 81 *spots* encontrados exclusivamente no perfil proteico das formas não tratadas e 63 *spots* nas formas tratadas, com um acúmulo diferencial de 29 *spots*. Dentre as proteínas diferencialmente acumuladas, o Fator de Iniciação Traducional (IF-2), importante na síntese proteica, apresentou-se reduzido sob efeito do PS-UA. Na ontologia gênica para regulação de processos biológicos, verificou-se que o PS-UA exerceu considerável influência com relação à expressão de proteínas. O PS-UA foi eficaz contra as formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* sem causar toxicidade às células de mamíferos, destacando-se como uma nova proposta de fármacos leishmanicidas.

Palavras-chave: Ácido úsnico. Toxicidade. *Leishmania infantum*. Morfologia. Proteômica

ABSTRACT

Leishmaniasis is as a serious public health problem in many countries of the world, affecting socially and economically vulnerable populations. The search for new phytochemicals with antiparasitic action, lower toxicity and low cost appears as an alternative to existing treatments. Some studies have shown that usnic acid (AU) has several biological activities (antiproliferative, antiviral, anti-inflammatory, antimicrobial and antiparasitic), however it presents high hepatotoxicity and low solubility. The soluble form of AU, potassium salt derived from single acid (PS-UA) or potassium usnate, has been used by some researchers to increase its efficacy and reduce its toxicity. The objective of this study was to analyze the *in vitro* leishmanicidal activity of AU and PS-UA against *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* promastigotes and macrophage cytotoxicity (RAW 264.7); as well as to evaluate if these compounds interfere in the morphology of the parasites. AU was isolated from the crude lichen extract *Cladonia substellata* Vainio and the PS-UA was obtained from the salinization of this extract. The antiprotozoal activity of AU and PS-UA against promastigotes of *L. (L.) infantum chagasi* and cell viability were evaluated by the MTT assay. Structural and ultrastructural analyzes of the parasites were performed by electron microscopy. In addition, two-dimensional gel electrophoresis (2D) and mass spectrometry (MALDI-TOF/TOF) were used to highlight and identify proteins differentially expressed by promastigote forms of the parasites under the action of PS-UA (6,25 $\mu\text{g/mL}$). The IC_{50} of AU and PS-UA against *L. (L.) infantum chagasi* promastigotes were determined (18.30 ± 2.00 and $3.71 \pm 2.99 \mu\text{g/mL}$, respectively) and the concentration of IC_{50} of PS-UA was found to be seven times less toxic to macrophages ($\text{CC}_{50} = 26.31 \pm 13.55 \mu\text{g/mL}$, $\text{IS} = 7$). Analysis of the parasites by scanning electron microscopy revealed surface and shape changes (according to the determined IC_{50} concentrations). The following ultrastructural changes were observed: under AU action, swelling of the parasites, loss of cell polarity and increase in the number of cytoplasmic vacuoles were detected; already under action of the PS-UA was observed changes in nuclear chromatin, intense cytoplasmic vacuolization, extensive mitochondrial swelling, lipid bodies and electron-dense vesicles throughout the cytoplasm. A total of 450 protein *spots* were observed through the electrophoresis (2D) and in the comparative analysis of the proteomic profiles between the promastigote forms treated with PS-UA and the untreated forms, 173 *spots* were revealed, 81 *spots* found exclusively in the protein profile of untreated forms and 63 *spots* in the treated forms, with a differential accumulation of 29 *spots*. Among the differentially accumulated proteins, the Translation initiation factor (IF-2), important in the protein synthesis, was reduced under the effect of PS-UA. In the gene ontology for regulation of biological processes, it was verified that the PS-UA exerted considerable influence with respect to the expression of proteins. The PS-UA was effective against the promastigote forms of *L. (L.) infantum chagasi* without causing toxicity to mammalian cells, standing out as a new proposal of leishmanicidal drugs.

Keywords: Usnic acid. Toxicity. *Leishmania infantum*. Morphology. Proteomics

LISTA DE FIGURAS

	Págs.
Figura 1 - Formas evolutivas de <i>Leishmania</i> sp. A: promastigota B: amastigota. Corpos Multivesiculares (MVBs) e Retículo Endoplasmático (RE).....	21
Figura 2 - Flebótomo do gênero <i>Lutzomya</i> (<i>Lutzomya longipalpis</i>), fêmea durante repasto sanguíneo.....	22
Figura 3 - Ciclo de vida das <i>Leishmanias</i>	23
Figura 4 - Distribuição da Leishmaniose visceral no mundo, 2013.....	27
Figura 5 - Talo de <i>Cladonia substellata</i> (Vainio) em seu ambiente natural, Mamanguape (PB).....	30
Figura 6 - Cristais de ácido úsnico, extraído, isolado e purificado da <i>Cladonia substellata</i> (Vainio) no Laboratório de Produtos Naturais da UFPE.....	31
Figura 7 - Estrutura química do ácido úsnico.....	32
Figura 8 - Estrutura química do ácido úsnico. R= OH –ácido úsnico; R=OK – usnato de potássio.....	38

LISTA DE TABELAS

Pág.

Tabela 1 - Parâmetros para busca de dados a partir dos espectros do MALDI TOF.... 49

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AU - Ácido Úsnico

BOD - Biochemical Oxygen Demand

BSA - Albumina de Soro Bovino

CETENE - Centro de Tecnologias Estratégicas do Nordeste

CO₂ - Dióxido de Carbono

CDC - Center for Disease Control

CC₅₀ - Concentração Inibitória de 50% das células

CHAPS - Cloroamidopropil Dimetilamônio Propano Sulfonato

DMSO - Dimetilsulfóxido

DMEM - *Dubelcco's Modified Eagle's Medium*

DAPs - Peptídeos Diferencialmente Acumulados

DNA - Ácido Desoxirribonucleico

DTT - Ditioneitol

GO - Gene Ontology (Ontologia Gênica)

H₂O₂ - Peróxido de Hidrogênio

IAA - Iodoacetamida

IC₅₀ - Concentração Inibitória de 50% dos parasitas

IEF - Focalização Isoelétrica

IPG - pH Imobilizado em gradiente

LIT - Liver Infusion Tryptose

LV - Leishmaniose Visceral

LPS - Lipopolissacarídeo

MALDI - Matriz-assisted Laser Desorption/ionization (Dissorção/ionização à laser assistida por Matriz)

m/z - Relação massa/carga

MET - Microscopia Eletrônica de Transmissão

MEV - Microscopia Eletrônica de Varredura

MTT - 3-(4, 5-dimethylthiazol-2-yl)-2, 5-Diphenil Tetrazolium Bromide

MS - Espectrometria de Massas

NADPH - Nicotiamida Adenina Dinucleotídeo Fosfato Reduzido

PBS - Tampão Salina Fosfato

PMF - Peptide Mass Fingerprint

PS - Fosfatidilserina

SFB - Soro Fetal Bovino

SDS-PAGE - Gel de Poliacrilamida Dodecil Sulfato de Sódio

TCA - Ácido Tricloroacético

TFA - Ácido Trifluoroacético

TOF - Time-of-Flight (Tempo de vôo)

UP - Usnato de Potássio

UV - Ultra-violeta

WHO - World Health Organization

1D - Eletroforese unidimensional

2D - Eletroforese bidimensional

SUMÁRIO

	<i>Pags</i>
1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 JUSTIFICATIVA.....	18
1.2 OBJETIVOS.....	19
1.2.1 Objetivo geral.....	19
1.2.2 Objetivos específicos.....	19
2. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
2.1 LEISHMANIOSES.....	20
2.1.1 Epidemiologia da Leishmaniose visceral.....	26
2.2 LÍQUENS.....	28
2.2.1 Ácido úsnico.....	30
2.2.1.1 Análise química do ácido úsnico.....	31
2.2.1.2 Atividades biológicas do ácido úsnico.....	32
2.2.1.2.1 Atividade Antimicrobiana.....	33
2.2.1.2.2 Atividades antiinflamatória, analgésica e antipirética.....	34
2.2.1.2.3 Atividade Antitumoral.....	34
2.2.1.2.4 Atividade Antiviral.....	35
2.2.1.2.5 Atividade Antiparasitária.....	36
2.2.1.2.6 Toxicologia.....	37
2.2.2 Usnato de potássio.....	37
2.2.2.1 Análise química do usnato de potássio.....	37
2.2.2.2 Atividades biológicas do usnato de potássio.....	38
2.3 ESTUDO PROTEÔMICO DE LEISHMANIA.....	38
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	40
3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL LIQUÊNICO.....	40
3.2 MANUTENÇÃO DA CEPA DE <i>Leishmania infantum chagasi</i>	40
3.3 MANUTENÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS (RAW 264.7).....	41
3.4 BIOENSAIOS.....	41
3.4.1 Avaliação da atividade leishmanicida do usnato de potássio.....	41
3.4.2 Ensaio de citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7.....	42
3.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA DE PROMASTIGOTAS DE <i>L. infantum chagasi</i>	42
3.5.1 Microscopia invertida com contraste de fase.....	42
3.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV).....	43
3.5.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET).....	43
3.6 ANÁLISE PROTEÔMICA.....	44
3.6.1 Cepas de <i>Leishmania</i>	44

3.6.2 Preparação do extrato proteico.....	44
3.6.3 Quantificação das proteínas.....	45
3.6.4 Eletroforese unidimensional.....	45
3.6.5 Eletroforese bidimensional.....	45
3.6.5.1 Focalização isoeletrica.....	45
3.6.5.2 Gel de poliacrilamida 2D (SDS-PAGE).....	46
3.6.5.3 Coloração dos géis.....	46
3.6.5.4 Obtenção das imagens.....	47
3.6.5.5 Digestão dos spots.....	47
3.6.5.6 Espectrometria de massas (MS).....	48
3.6.5.7 Identificação das proteínas.....	48
3.6.5.8 Análise das informações.....	49
3.6.5.9 Identificação de processos biológicos associados com proteínas diferencialmente acumuladas.....	49
3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
3.7.1 Análise estatística dos dados relacionados a atividade leishmanicida do ácido úsnico.....	50
3.7.2 Análise estatística dos dados relacionados as atividades leishmanicida e citotóxica do usnato de potássio.....	50
3.7.3 Análise estatística dos dados relacionados ao estudo proteômico.....	50
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	51
4.1 ARTIGO PUBLICADO NA <i>THE SCIENTIFIC WORLD JOURNAL</i>	51
4.2 MANUSCRITO A SER ENCAMINHADO PARA A <i>PLOS ONE</i>	52
4.3 MANUSCRITO A SER ENCAMINHADO PARA A <i>PLOS ONE</i>	53
5 CONCLUSÕES.....	54
6 PERSPECTIVAS.....	55
REFERÊNCIAS.....	56

1 INTRODUÇÃO

Leishmanioses compõem um grupo de doenças causadas por um protozoário do gênero *Leishmania*, que afeta principalmente pessoas carentes da África, Ásia e América Latina, estando associada com a desnutrição, deslocamento populacional, moradia precária, imunodeficiência e falta de recursos financeiros; sendo endêmica em 97 países do mundo, com mais de 350 milhões de pessoas em risco e dois milhões de novos casos por ano, com uma mortalidade anual de aproximadamente 60.000 casos por ano, um número somente superado pela malária dentre as doenças parasitárias (HOTEZ, 2007; WHO, 2010; WHO, 2016).

Os parasitas são transmitidos ao homem através da picada da fêmea do inseto *Lutzomyia sp.* e de acordo com o quadro clínico apresentado pelos pacientes, as principais espécies do parasito causam, pelo menos, três formas da doença no homem: Leishmaniose Cutânea (*L. tropica*; *L. major*), Leishmaniose Mucocutânea (*L. braziliensis*; *L. mexicana*; *L. amazonensis*) e Leishmaniose Visceral (*L. donovani*; *L. infantum chagasi*). No Brasil, as leishmanioses estão presentes em áreas urbanas e suburbanas, sendo a espécie de *Leishmania infantum chagasi* o agente etiológico da Leishmaniose Visceral (LV), enquanto a *Leishmania amazonensis* está associada à forma cutânea da doença (MONTE NETO et al., 2011).

A busca de novos fármacos com ação leishmanicida tem sido constante, principalmente pela elevada toxicidade de substâncias de primeira escolha para o tratamento dessa doença, como o Glucantime® e Pentostam®; que mesmo assim, não apresentam a eficácia desejada (GONTIJO; MELO, 2004; NUNES, 2008; WHO, 2010).

Recentemente, revisões na quimioterapia frente a leishmaniose enfatizam as deficiências destes agentes terapêuticos, atualmente disponíveis no mercado e já mostram a necessidade urgente de novas alternativas (CROFT et al., 2005; 2006).

Considerando as dificuldades em relação ao tratamento das leishmanioses e a ausência de vacinas, há urgência pela busca de novos fármacos, dentre as quais se incluem os fitoterápicos. Pesquisas têm demonstrado o uso popular de produtos naturais no tratamento de leishmanioses tanto por via oral, como na aplicação tópica sobre as lesões cutâneas (BEZERRA et al., 2006).

Os líquens, produto da associação entre diferentes fungos e algas, produzem metabólitos resultantes de rotas secundárias, denominados substâncias liquênicas, também conhecidas como ácidos liquênicos. Atualmente, sabe-se que se trata de derivados fenólicos e carboidratos exclusivos, sendo que esses metabólitos são os principais responsáveis por grande parte de sua bioatividade (LLANO, 1951; VICENTE, 1975; XAVIER-FILHO; RIZZINI, 1976; HALE Jr., 1983).

O ácido úsnico (AU) é um metabólito encontrado principalmente nos líquens do gênero *Cladonia* e *Usnea*, representando cerca de 6% do peso seco do talo, desempenhando importante papel biológico, conferindo proteção frente a microrganismos invasores, raios ultra-violeta (UV) e ressecamento (INGOLSDÓTTIR, 2002; COCCHIETTO et al., 2002).

Estudos farmacológicos mostraram que o AU possui várias atividades biológicas, tais como: antimicrobiana (HALE Jr., 1983; LAUTWERWEIN, 1995; COCCHIETTO et al., 2002), antiviral (SCIRPA et al., 1999; CAMPANELLA et al., 2002), antiprotozoário (WU et al., 1995; SI et al., 2016), antiproliferativa (CARDARELLI et al., 1997; IVANOVA, 2010), analgésica e antipirética (OKUYAMA et al., 1995), larvicida contra larvas de *Culex pipiens* e *Culiseta longiareolata* (CETIN et al., 2008; 2011), antitumoral (HALICI et al., 2005) e antiparasitária (De CARVALHO et al., 2005; SALLOUM et al., 2012; SHANG et al., 2014).

A aplicação terapêutica do AU não tem sido introduzida em decorrência de sua baixa solubilidade e elevada hepatotoxicidade. O uso seguro e eficiente deste composto

requer o desenvolvimento de formas farmacêuticas viáveis (naturais ou sintéticas) que sejam solúveis em água, menos tóxicas e que apresentem pelo menos a mesma atividade biológica. Visando aumentar a solubilidade, derivados do AU foram sintetizados tais como: usnato de sódio e de potássio, que são solúveis em água (MARTINS et al., 2014).

Jin et al. (2006) revelaram que o usnato de sódio, possui a mesma propriedade biológica do AU, apresentando propriedades cicatrizantes; onde seu mecanismo de ação foi de intensificar a secreção de fatores de crescimento e de acelerar a migração celular dos queratinócitos (efeito dose-dependente).

Shibata et al. (1948) estudaram a atividade antimicrobiana do AU nas suas formas enantioméricas e seus derivados, dentre eles o usnato de sódio foi o único que apresentou atividade comparada ao mesmo. Quanto as atividades biológicas do usnato de potássio, a literatura é bastante escassa e dentre os poucos estudos realizados, tem-se referido a atividade moluscicida frente à *Biomphalaria glabrata* (MARTINS, 2014).

Diante do exposto, pretendeu-se avaliar e analisar comparativamente a atividade leishmanicida do derivado usnato de potássio com a do ácido úsnico, obtido do líquen *Cladonia substellata* Vainio, frente às formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi*; desse modo, contribuindo para ampliar o perfil de novos fitofármacos com eficácia e menor toxicidade, para o tratamento das Leishmanioses.

1.1 JUSTIFICATIVA

A quimioterapia das leishmanioses apresenta vários aspectos limitantes devido à toxidez e/ou ineficácia dos fármacos disponíveis. Modificações químicas nos metabólitos naturais promovem o surgimento de outros compostos, podendo ou não aumentar a atividade biológica; representando assim uma estratégia bem conhecida na química medicinal. O usnato de potássio é um produto da substituição de um hidrogênio no carbono 8 da molécula do ácido úsnico por um potássio, o que altera as suas propriedades químicas, tornando-o solúvel em água e capacitando-o para o desenvolvimento de fármacos com potencial atividade no tratamento das leishmanioses. Em decorrência da elevada toxicidade dos fármacos tanto de primeira quanto de segunda escolha para o tratamento dessa doença, tem aumentado cada vez mais o interesse pela procura de novas opções terapêuticas à base de produtos naturais, com comprovada atividade farmacológica, baixa toxicidade e que possam ser economicamente acessíveis à população. Um estudo mais aprofundado desses derivados liquênicos frente às formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* tem sido proposto neste estudo e são fornecidas informações importantes para reforçar o desenvolvimento de um novo fármaco.

1.2 OBJETIVOS

1.2.1 Objetivo Geral

Realizar um estudo comparativo da atividade leishmanicida *in vitro* do ácido úsnico e de seu derivado usnato de potássio, frente as formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*, e avaliar os efeitos citotóxicos em macrófagos murinos.

1.2.2 Objetivos Específicos

- Extrair e purificar o ácido úsnico; assim como realizar a síntese do usnato de potássio;
- Comparar a atividade leishmanicida *in vitro* do ácido úsnico com o seu derivado usnato de potássio frente às formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*;
- Avaliar o efeito citotóxico do usnato de potássio em macrófagos RAW 264.7;
- Estudar a morfologia dos macrófagos RAW 264.7 submetidos à ação do usnato de potássio;
- Analisar a ultraestrutura das formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, através da Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET) e a morfologia dos parasitas através da Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV), observando-se os efeitos da ação do ácido úsnico e do usnato de potássio nesses parasitas;
- Realizar eletroforese bidimensional (2D) dos extratos proteicos das formas promastigotas da *L. (L.) infantum chagasi*, sob efeito do usnato de potássio;
- Obter o padrão proteico bidimensional expresso pelo genoma das formas promastigotas da *L. (L.) infantum chagasi* tratadas com o usnato de potássio;
- Localizar conjuntos de proteínas diferencialmente acumuladas nos extratos proteicos das formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* tratadas com usnato de potássio;
- Identificar as proteínas diferencialmente acumuladas nos extratos proteicos das formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* tratadas com o usnato de potássio por espectrometria de massas (MALD-TOF/TOF).

2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

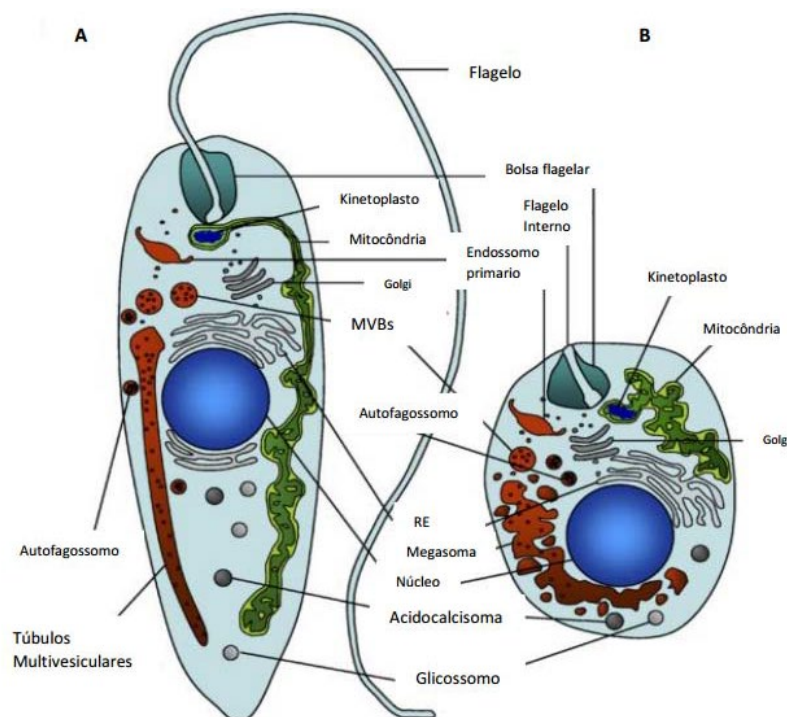
2.1 LEISHMANIOSES

As leishmanioses são causadas por parasitas do gênero *Leishmania*. A doença é endêmica nos trópicos, nas regiões subtropicais e mediterrâneas. Existem três formas clínicas principais, causadas por diferentes espécies de *Leishmania*, que são a cutânea, a subcutânea, reconhecidas pela presença de feridas dolorosas que podem levar meses para serem curadas; e a forma visceral, que pode resultar em febre, perda de peso e danos aos órgãos internos tais como o baço e fígado, sendo fatal quando não tratada (CHAPPUIS; SUNDAR; HAILU, 2007).

Em 2015, cerca de 88,8% dos casos globais de leishmaniose visceral foram relatados em seis países: Brasil, Etiópia, Índia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Os 10 países com maior número de casos notificados em 2015 foram: Afeganistão, Argélia, Brasil, Colômbia, Irã, Iraque, Peru, Síria, Tunísia e Iêmen, que juntos representam 90% da incidência de leishmaniose cutânea global notificada (WHO, 2016).

A *Leishmania sp.* apresenta duas formas morfológica e fisiologicamente distintas: promastigota e amastigota (**Figura 1**). A forma promastigota é extracelular e é encontrada no trato digestório dos hospedeiros invertebrados ou em meios de cultura apropriados; apresenta-se com forma fusiforme e um longo flagelo livre, medindo cerca de 15 µm de comprimento, também possui núcleo, citoplasma e cinetoplasto (NAKAMURA et al., 2006; NUNES, 2008; SANTOS et al., 2008).

Figura 1: Formas evolutivas de *Leishmania* sp. **A:** promastigota; **B:** amastigota. Corpos Multivesiculares (MVBs) e Retículo Endoplasmático (RE).



Fonte: Jaramillo, 2014.

A forma amastigota da *Leishmania* é um parasita obrigatoriamente intracelular em vertebrados, encontrada nas células do sistema fagocítico mononuclear, parasitando principalmente macrófagos. Esses parasitas apresentam-se com formas arredondadas ou ovais e com curto flagelo que não se exterioriza, medindo de 4 a 6 μm de comprimento por dois micrômetros de diâmetro, contendo núcleo, cinetoplasto e um vacúolo. Em ambos os casos, o ciclo de vida desses parasitas consiste em divisão binária, ou seja, divisão assexuada (NAKAMURA et al., 2006; NUNES, 2008; SANTOS et al., 2008).

As *Leishmanias* são transmitidas aos mamíferos por meio da picada de mosquitos hematófagos pertencentes à subfamília *Phlebotominae* e ao gênero *Lutzomia* (**Figura 2**). A infecção dos hospedeiros invertebrados ocorre durante o repasto sanguíneo da fêmea. Ao picarem o homem ou os animais silvestres infectados, os mosquitos ingerem macrófagos contendo formas amastigotas da *Leishmania* (SANTOS et al., 2008).

Figura 2: Flebótomo do gênero *Lutzomya* (*Lutzomya longipalpis*), fêmea durante repasto sanguíneo.



Fonte: <http://revistapesquisa.fapesp.br/2009/10/01/protecao-contraleishmaniose/>. Acesso: 16/01/2017.

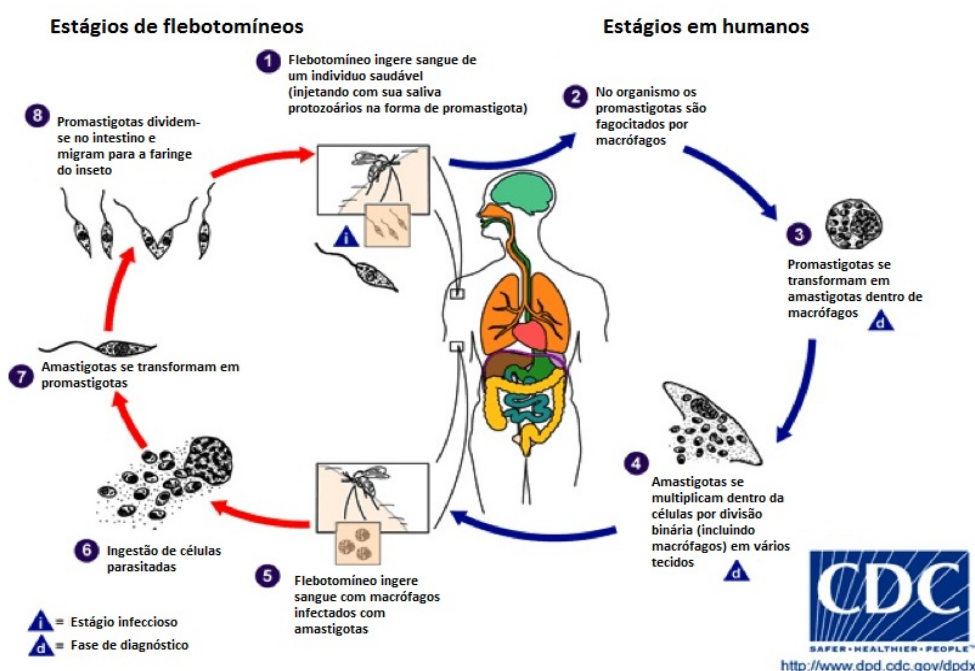
No intestino médio do flebótomo, as *Leishmanias* se transformam em flagelados pequenos, ovóides e pouco móveis, com alta taxa de multiplicação. Após alguns dias, surgem as formas promastigotas delgadas e longas, que se fixam nas vilosidades intestinais do inseto e estabelecem migração para as porções anteriores do tubo digestório, enquanto se transformam em promastigotas metacíclicos (CAMARGO; BARCINSKY, 2003; NUNES, 2008).

Os hospedeiros vertebrados são infectados quando formas promastigotas metacíclicas são regurgitadas pelas fêmeas ao picarem suas vítimas. As formas promastigotas são internalizadas através de endocitose via mecanismo mediado por receptor na superfície do macrófago e são fagocitadas, formando o fagossomo que se funde com o lisossomo que será chamado de fagolisossomo (CAMARGO; BARCINSKY, 2003; NUNES, 2008).

Dentro do fagolisossomo as formas promastigotas sofrem mudanças bioquímicas e metabólicas que resultam na forma obrigatória intracelular do parasita (amastigota). As formas amastigotas se multiplicam por divisão binária no macrófago e são liberados na

corrente sanguínea por um mecanismo ainda não totalmente caracterizado, levando a destruição da célula, onde elas são capazes de infectar células dendríticas, fibroblastos e novos macrófagos (**Figura 3**) (HANDMAN, 2002; McCONVILLE; HANDMAN, 2007).

Figura 3: Ciclo de vida da *Leishmania sp.*



Fonte: <http://saude.culturamix.com/doencas/doencas-parasitarias-prevencao-e-tratamento>.
Acesso: 15/03/2017.

A internalização de formas promastigotas ocorre por um processo clássico de fagocitose, mediado pelo reconhecimento receptor-ligante. Neste processo participam os receptores para o complemento CR1 e CR3 dos macrófagos, além de outros. Os receptores C3b e C3bi fixados nas formas promastigotas da *Leishmania* ligam-se aos receptores de macrófagos CR1 e CR3, respectivamente, mostrando o papel do receptor do complemento na internalização do parasito na célula hospedeira (ROBLEDO et al., 1994).

A opsonização pelo sistema complemento auxilia a entrada do parasita e a sobrevivência dele no macrófago, uma vez que os receptores CR1 e CR3 promovem a fagocitose sem ativar o “burst” respiratório. O “burst” respiratório é caracterizado pelo

aumento acentuado no consumo de oxigênio e consequente redução a ânion superóxido (O_2^-) tendo como doador de elétrons o NADPH. O ânion superóxido é convertido a peróxido de hidrogênio (H_2O_2) pela ação da enzima superóxido dismutase e tanto o ânion superóxido quanto o peróxido de hidrogênio destroem os patógenos fagocitados (MOSSER; EDELSON, 1987; MOSSER et al., 1987; CURNUTTE, 2004). Além disso, o receptor CR3 é capaz de inibir a resposta imune celular mediada por IL-12, que ativa as células fagocitárias (MARTH; KELSALL, 1997; DESCOTEAUX; TURCO, 1999).

Os mecanismos com os quais a *Leishmania sp.* resiste aos efeitos tóxicos da exposição aos oxidantes incluem a superfície glicolípídica de lipofosfoglicano (LPG) que retiram os produtos tóxicos de oxigênio e inibem a resposta do macrófago (CHAN, 1989; DESCOTEAUX, 1991); além de várias enzimas antioxidantes que têm sido identificadas e clonadas (ISMAIL, 1994; CUNNINGHAM, 1995). Neste contexto, a estrutura do LPG impede o acesso e a inserção do complexo C5b-9 na membrana, protegendo as formas promastigotas metacíclicas da lise pelo sistema complemento (PUENTES et al., 1990; McCONVILLE et al., 1992).

As formas promastigotas podem expor ou não a fosfatidilserina (PS). Aquelas formas promastigotas que expõem a PS são destinadas à morte, enquanto as que não expõem inibem a resposta inflamatória, provocando a síntese de TGF- β pelo macrófago, interrompendo a sua atividade inflamatória e colaborando para a sobrevivência do parasita (VAN ZANDBERGEN et al., 2006). As formas amastigotas ao exporem a PS na superfície, induzem a secreção de TGF- β e reduzem a síntese de óxido nítrico (NO) (WANDERLEY et al., 2005).

Apesar de poderem atravessar a pele, espécies distintas de *Leishmanias* têm preferências por diferentes órgãos, sendo capazes de causar lesões maiores ou menores, produzirem ou não metástases e poderem ser ou não auto curáveis. Logo, podem induzir imunidade permanente, temporária ou às vezes nenhuma. Todos esses fatores e suas possíveis combinações constituem os principais responsáveis pelos diversos

casos clínicos das leishmanioses (CAMARGO; BARCINSKY, 2003).

Por mais de 60 anos, os derivados de metais pesados, principalmente os pentavalentes antimoniais têm sido usados como fármacos de primeira escolha para o tratamento das leishmanioses. Entre eles, os principais são o estibogluconato de sódio (Pentostam[®]) e metilglucamina (Glucantime[®]). Supõe-se, que eles agem inibindo a síntese de ATP. Entretanto, os antimoniais causam muitos efeitos tóxicos, tais como: náusea, vômito, diarreia, erupções cutâneas, tontura, arritmia cardíaca, hipotensão, hepatite e pancreatite. Além disso, a administração desses fármacos se torna difícil por requererem internamento, podendo baixas dosagens favorecerem a resistência do parasita e altas dosagens apresentarem-se como tóxicas (MISHRA et al, 2007; MORENO et al., 2012).

Os mecanismos de ação reportados para os pentavalentes antimoniais são: bloqueio não específico de proteínas de amastigotas, inibição da DNA Topoisomerase I, e aumento da susceptibilidade dos parasitas ao estresse oxidativo pelo aumento do efluxo de tióis, glutatona e tripanotona, em virtude da alteração do potencial tiol redox (CHAKRABORTY et al., 1998; WALKER et al., 2004).

Na *Leishmania*, a mitocôndria é o alvo primordial e tem sido largamente explorada em muitos trabalhos que demonstraram a importância dessa organela na sobrevivência desse parasita. Estudos experimentais mostram que os fármacos de segunda escolha agem na mitocôndria, como por exemplo, a anfotericina B e a pentamidina, que causam uma rápida diminuição do potencial de membrana mitocondrial e uma influência simultânea sobre a permeabilidade da membrana citoplasmática (LEE et al., 2002).

A anfotericina B provou ser muito eficaz no tratamento dos casos refratários a terapia com antimoniais (CROFT et al., 2006; MISHRA et al., 2007). Entretanto, o seu uso é severamente restrito, devido aos numerosos efeitos colaterais e de resistência cruzada entre os

pentavalentes antimoniais e a anfotericina B. Esta resistência atingiu cerca de 64% de todos os casos em 2014 em Bihar (Índia); esses dados reforçam a necessidade de novos fármacos para atuarem contra as leishmanioses (ROSENTHAL et al., 2009).

Outro provável mecanismo de ação para os fármacos leishmanicidas tem como base uma alteração dos níveis de colina, um precursor para a formação de fosfatidilcolina, o fosfolípido mais abundante na membrana e no citoplasma da *Leishmania sp.* (ZUFFEREY; MAMOUN, 2002).

Diferentes tipos de fármacos têm sido testados, recentemente, como as pentamidinas consideradas efetivas contra a leishmaniose cutânea e, embora bem tolerada, elas podem causar *Diabetes mellitus* em altas doses (MORENO et al., 2012). Em 2002, a miltefosina foi aprovada na Índia como o primeiro tratamento ativo por via oral para a LV, e vem apresentando bons resultados clínicos para a forma cutânea da doença (SINDERMANN, 2004; MARGARET et al., 2012).

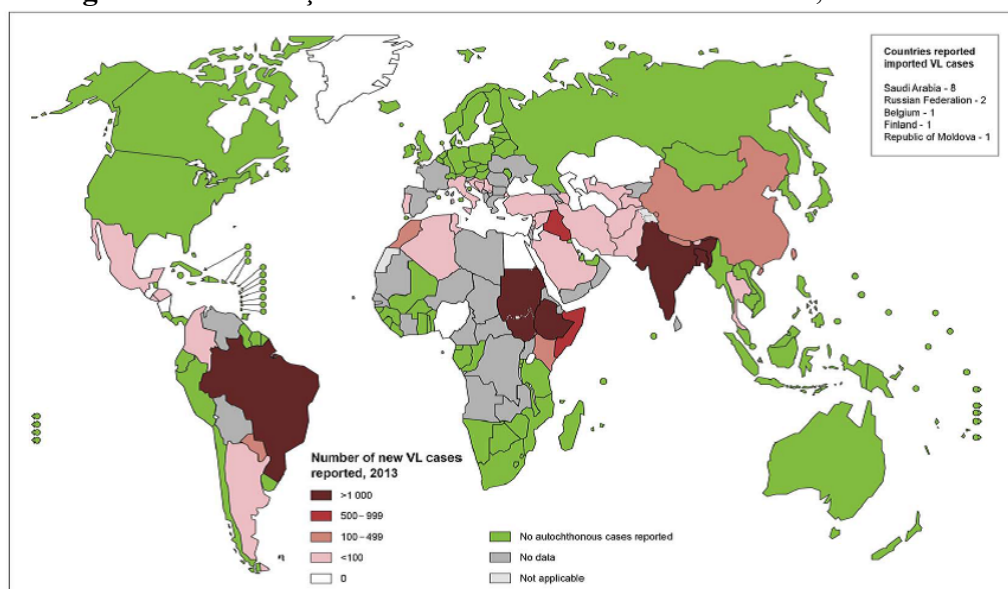
A resistência aos quimioterápicos é um obstáculo real para os tratamentos das leishmanioses. Portanto, o aprimoramento das pesquisas de espécies vegetais é um caminho importante para o fornecimento de dados científicos na síntese de novos fitofármacos, ao mesmo tempo em que tem seu uso validado pela medicina popular. Entretanto, são necessários ensaios *in vitro* para o conhecimento do efeito de seus princípios ativos, para que possam ser utilizados no combate a leishmaniose ou mesmo no tratamento de outras parasitoses (OLIVEIRA et al., 2000).

2.1.1 Epidemiologia da leishmaniose visceral

A leishmaniose visceral é uma zoonose com ampla distribuição mundial e registro de casos em todos os continentes, à exceção da Oceania. Dos casos registrados na América Latina, 90% ocorreram no Brasil, segundo a Organização Mundial da Saúde (WHO, 2010).

Devido à sua magnitude e alta letalidade, principalmente em indivíduos não tratados e crianças desnutridas, e ao fato de ser emergente em portadores da infecção por HIV, a LV é considerada pela WHO (2010) uma das seis doenças endêmicas de maior relevância no mundo (Figura 4).

Figura 4: Distribuição da Leishmaniose visceral no mundo, 2013



Fonte: http://gamapserver.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_2013_VL.png. WHO.
Acesso: 15/03/2017.

Em 2015 foram registrados casos autóctones em 20 unidades federadas de quatro regiões do Brasil. Apesar de o maior número de casos estarem na região Nordeste, ao se analisar a série histórica observa-se uma redução dos casos nesta região, que passou de 83% (4.029/4.858) do total de casos confirmados em 2000, para 54,9% (1.806/3.289) em 2015. Nos últimos 5 anos (2010-2015) a doença vem reduzindo, de forma gradativa, para as regiões Norte, Sudeste e Centro-Oeste, que passaram de 44,4% (1.568/3.526) do total de casos em 2010, para 35,3% (1.164/3.289) em 2015, segundo informações disponíveis no Sinan-SVS/MS (BRASIL, 2016).

A letalidade da LV tem aumentado gradativamente, passando de 3,2% em 2000, para 6,3% em 2010 e para 7,8% em 2015. Destaca-se que as maiores ocorrências de letalidade

foram verificadas no biênio 2003-2004, quando alcançaram 8,5% e 8,3% (BRASIL, 2016).

Os dados mostram que a letalidade associada à doença foi considerada elevada e que apesar dos grandes progressos feitos na compreensão da bioquímica e da biologia molecular do parasita, os tratamentos de primeira escolha não apresentaram eficácia desejada, além de serem tóxicos para os pacientes (GONTIJO; MELO, 2004; NUNES, 2008).

Pernambuco ocupa o 4º lugar em casos confirmados da região Nordeste e registrou, no ano de 2015, 123 casos representando cerca de 6,8% (123/1.806) do total. O Estado do Maranhão apresenta uma incidência de LV de 29,8% (539/1.806), ocupando o 1º lugar do *ranking*. A doença acomete indivíduos de todas as faixas etárias, entretanto, crianças, adolescentes e adultos jovens apresentaram as maiores taxas de infecção (BRASIL, 2016).

2.2 LÍQUENS

Os líquens são formados através da simbiose entre os fungos (micobiontes) e as algas e/ou as cianobactérias (fotobiontes). A morfologia destes organismos pode diferir de líquens incrustantes que crescem na rocha, dos líquens das árvores, solo ou outros substratos. Um número de cerca de 17.000 espécies conhecidas tem sido usado pela humanidade, para tingimento, monitoramento da poluição, perfumaria, decoração, para fins dietéticos e uso medicinal (INGÓLFSDOTTIR, 2002).

A maioria dos líquens desenvolve internamente um talo estratificado dividido em córtex superior, camada fotobionte, medula e córtex inferior (FRIEDL; BUDEL, 1996). O córtex superior é composto de hifas entrelaçadas, que serve de proteção para camada das algas. Centralmente encontra-se uma camada de hifas frouxas, a medula, seguida de outro feixe de hifas, o córtex inferior. O fungo geralmente é responsável não só pela forma, como também pela estrutura do líquen, contribuindo as hifas para a maior parte da sua massa. Cortes transversais de certas espécies de líquens, observados ao microscópio óptico,

demonstram as algas distribuídas, mais ou menos homoganeamente, em todo o talo, enquanto as hifas se aglomeram junto às superfícies, superior e inferior da mesma (HALE Jr., 1983; NASH, 1996).

A associação simbiótica dos líquens envolve uma estreita integração fisiológica, onde o fungo liquênico retém água protegendo o fotobionte contra dessecação, e os ácidos liquênicos pigmentados aumentam a opacidade do córtex superior, reduzindo a incidência de luz na camada de alga, servindo como filtro seletivo, permitindo o fotobionte se desenvolver em ambientes de alta luminosidade. Em contrapartida, as algas fornecem vitaminas, nitrogênio (simbiose com cianobactéria) e substâncias orgânicas necessárias ao desenvolvimento do micobionte (HALE Jr., 1983; NASH, 1996). Eles são capazes de sintetizar vários metabólitos compreendendo compostos alifáticos, cicloalifáticos, aromáticos e terpênicos (HUNECK, 1999).

Os líquens produzem dois tipos diferentes de metabólitos, primário e secundário. Os metabólitos primários são de origem intracelular com função estrutural e papel no metabolismo celular. São sintetizados independentemente por ambos os simbiontes (PODTEROB, 2008). Os metabólitos secundários são secretados exclusivamente pelos fungos formando cristais que são depositados principalmente na hifa fúngica no espaço extracelular (LAWREY, 1984; ELIX, 1996). Estes metabólitos secundários são frequentemente abundantes, espécies-específicos, e suas composições e concentrações variam entre as diferentes camadas do talo (FAHSELT, 1994; HYVÄRINEN et al., 2000).

O papel biológico dos metabólitos secundários dos líquens pode ser resumido como a seguir: (1) eles têm um papel antibiótico contra outros microrganismos, (2) aumentam a permeabilidade da membrana do fotobionte, (3) inibem o crescimento e a germinação de mudas de plantas e de musgos, (4) absorvem a luz ultravioleta e por isso protegem os fotobiontes da radiação excessiva, (5) eles formam uma base para defesa dos alimentadores de

líquens e, (6) substâncias hidrofóbicas medulares previnem o afogamento do tecido e permitem a troca gasosa contínua (LAWREY, 1984; FAHSELT, 1994; ELIX, 1996). Segundo Hale (1983), variações de temperatura, umidade e luminosidade podem interferir na atividade fisiológica dos líquens, afetando a síntese de seus metabólitos.

Cladonia substellata Vainio (**Figura 5**) é uma das espécies que produz ácido úsnico dentre outras substâncias como resultado de seu metabolismo secundário, podendo ocorrer variações na sua concentração, dependendo de fatores como idade do talo, local e estação do ano em que a espécie for coletada, fatores genéticos, dentre outros (QUILHOT, 1988; AHTI, 2000).

Figura 5: Talo de *Cladonia substellata* (Vainio) em seu ambiente natural, Mamanguape (PB).

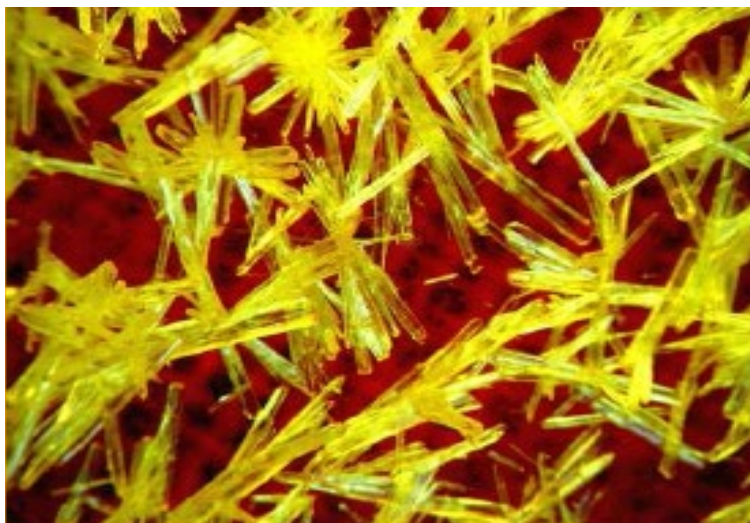


Fonte: Barbosa, 2009

2.2.1 Ácido úsnico

O ácido úsnico (**Figura 6**) existe na natureza na forma levógira (-) e dextrógira (+), sendo considerado o mais abundante metabólito secundário de espécies tais como: *Usnea*, *Cladonia* e *Cetraria* (CULBERSON, 1969). Foi isolado inicialmente pelo cientista alemão W. Knop em 1844 e obtido pela primeira vez por Curd e Robertson em 1933.

Figura 6: Cristais de ácido úsnico, extraído, isolado e purificado da *Cladonia substellata* (Vainio) no Laboratório de Produtos Naturais da UFPE.



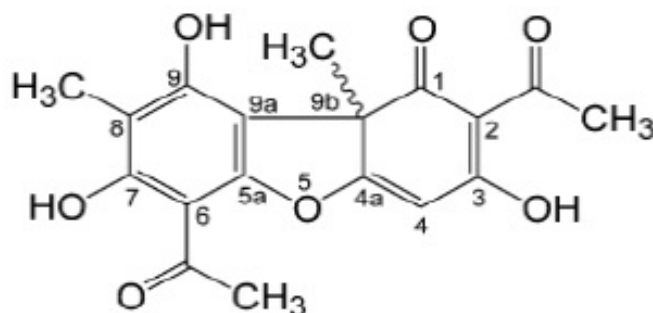
Fonte: Acervo de fotos do Laboratório de Produtos Naturais - UFPE.

2.2.1.1 Análise química do ácido úsnico

O ácido úsnico [2,6-diacetil-7,9-dihidroxi-8,9b-dimetil-1,3(2H,9bH)-dibenzo-furandiona; $C_{18}H_{16}O_7$] é um pigmento amarelo e existe na natureza em duas formas enantioméricas, dependendo da projeção do grupo metil na posição 9b da cadeia (**Figura 7**), podem ser ácido úsnico (+) ou (-). O ácido úsnico é praticamente insolúvel em metanol e água, e solúvel em outros solventes orgânicos, tais como: dimetilsulfóxido, acetona, clorofórmio, acetato de etila e diclorometano (ZHAO et al., 2010). É largamente distribuído em espécies de *Cladonia* (Cladoniaceae), *Usnea* (Usneaceae), *Lecanora* (Lecanoraceae), *Ramalina* (Ramalinaceae), *Evernia*, *Parmelia* (Parmeliaceae), e outros gêneros de líquens (INGÓLFSDÓTTIR, 2002).

Além da denominação mais comum como ácido úsnico também pode ser chamado de usneína (CARDARELLIA et al., 1997; INGÓLFSDÓTTIR, 2002).

Figura 7: Estrutura química do ácido úsnico



Fonte: INGÓLFSDÓTTIR, 2002.

2.2.1.2 Atividades biológicas do ácido úsnico

O Ácido Úsnico (AU) é um dos mais abundantes metabólitos secundários dos líquens e tem sido largamente estudado. Tem várias atividades biológicas, tais como antibiótico (SHIBATA et al., 1948; LAUTWERWEIN et al., 1995; COCCHIETTO *et al.*, 2002; FRANCOLINI et al. 2004; ELO; MATIKAINEN; PELTTARI, 2007), antiviral (CAMPANELLA et al., 2002; SCIRPA et al., 1999), analgésica e antipirética (OKUYAMA et al., 1995), como também propriedades anti-inflamatórias (VIJAYAKUMAR et al., 2000; HUANG et al., 2011) e antiparasitária (De CARVALHO et al., 2005; SHANG et al., 2014; SI et al., 2016). O AU induz apoptose dependente da dose e do tempo (BEZIVIN et al., 2004) e exibe atividade anti-proliferativa contra células de câncer de mama MCF7 (MAYER et al., 2005).

Abo-Khatwa et al., (1996) demonstraram que o AU apresenta características semelhantes ao 2,4 dinitrofenol (DNP), um clássico desacoplador da fosforilação oxidativa, atuando nas mitocôndrias das células do fígado de rato. Pesquisadores chineses mostraram que o AU (-) apresenta um efeito inibitório *in vitro* contra o protozoário patogênico *Trichomonas vaginalis* em concentrações levemente mais baixas do que o metronidazol (WU et al., 1995). Do ponto de vista ambiental, o AU tem sido usado no desenvolvimento de

agentes antimicrobianos para a agricultura, herbicidas e inseticidas (INGÓLFSDÓTTIR, 2002).

In vivo, o AU provavelmente é produzido pelos líquens para fins de defesa e então apresenta um papel de uma fitoalexina (do grego *phyton* = planta e *alexin* = composto que repele) produzido pelas plantas. Dessa forma, a presença de agentes poluentes parece estimular a biossíntese de ácido úsnico pelos líquens, os quais podem ser indicados para biomonitoramento ambiental (NOBUO, 1991).

2.2.1.2.1 Atividade Antimicrobiana

O AU é um agente antimicrobiano que possui atividade contra bactérias Gram-positivas, incluindo *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, e *Enterococcus faecium* (SHIBATA et al., 1948; LAUTWERWEIN et al., 1995).

Lautwerwein et al. (1995) testaram a atividade não só do AU, mas também do ácido vulpínico, outro metabólito secundário frente à várias bactérias Gram-positivas e fungos. Os referidos ácidos não apresentaram efeitos contra as bactérias Gram-negativas e foi verificado que o ácido vulpínico foi menos ativo que o AU.

Francolini et al. (2004) testaram a atividade do AU na formação de biofilmes bacterianos produzidos por *Pseudomonas aeruginosa* e *Staphylococcus aureus*, como um polímero de superfície utilizado em substituição de tecidos lesados, tendo sido demonstrado a inibição do crescimento do biofilme por *Staphylococcus aureus* e apenas alterações na morfologia do biofilme formado pela *Pseudomonas aeruginosa*.

Elo, Matikainen e Pelttari (2007) testaram a atividade antimicrobiana do AU e do seu derivado usnato de sódio contra isolados de *Enterococcus* resistentes a vancomicina (VRE) e contra *Staphylococcus aureus* resistentes a meticilina (MRSA), comparando-os a

ampicilina, ressaltando a importância da biodisponibilidade (através da solubilização do AU) e a questão da hepatotoxicidade provocada por este fitofármaco.

2.2.1.2.2 Atividades antiinflamatória, analgésica e antipirética

Vijayakumar et al. (2000) compararam a atividade anti-inflamatória do AU em ratos com a produzida pelo ibuprofeno, no tratamento oral depois da indução de edema em pata traseira de ratos por uso da carreginina. O resultado indicou eficácia do composto natural, comparado com a droga de referência, o ibuprofeno.

Huang et al. (2011) observaram os efeitos anti-inflamatórios exercido pelo AU após estímulo das células RAW 264.7 pelo lipopolissacarídeo (LPS). Os efeitos do AU devem-se a supressão do gene NF- κ B, responsável pela ativação da transcrição gênica das interleucinas pró-inflamatórias, enzimas como ciclooxigenase 2 (COX-2) e óxido nítrico (NO), além de estimular a liberação citocina anti-inflamatória IL-10 e do mediador heme-oxigenase-1 (HO-1).

As atividades analgésica e antipirética do AU foram avaliadas, oralmente em camundongos, por Okuyama et al. (1995). Esses pesquisadores demonstraram que a administração de uma determinada dose de AU, tem atividade analgésica comprovada; avaliada através do método de pressão na cauda do animal e estabeleceram ainda que outras doses teriam atividade significativa contra a hipertermia induzida por lipopolissacarídeos. Estes dados sugeriram que o mecanismo de ação do AU estaria, possivelmente, relacionado à inibição da síntese das prostaglandinas.

2.2.1.2.3 Atividade Antitumoral

Kupchan e Kopperman (1975) foram os primeiros a relatarem a atividade antitumoral do AU frente ao carcinoma de fígado de Lewis (LLC). Cardarelli et al. (1997) demonstraram propriedades inibitórias do AU sobre o crescimento das células Ishikawa K-562 e HEC-50.

A inibição foi considerada dose e tempo dependentes. O mecanismo de ação sugerido foi a interferência em algum passo importante da divisão celular, com o surgimento de diferentes tipos de células.

2.2.1.2.4 Atividade Antiviral

Perry et al. (1999) demonstraram que o AU inibiu a ação citopática do vírus do herpes simples 1 e o poliovírus. Um composto a base de sulfato de zinco e AU foi utilizado como terapia adjuvante, após radiocirurgia, de infecções genitais causadas pelo papiloma vírus humano (HPV). Scirpa et al. (1999) avaliaram a eficácia e segurança da administração intravaginal deste composto, que apresentaram uma ótima resposta ao tratamento da infecção causada por HPV, favorecendo o processo de reconstituição do epitélio com poucos efeitos colaterais e uma boa complacência do paciente.

Campanella et al. (2002) demonstraram que a síntese do RNA do poliomavírus que infectavam as células 3T6 (fibroblastos de camundongo) foi severamente inibida pela presença do AU. A replicação do DNA foi também inibida em concentrações não citotóxicas (5-10 µg/mL).

Sokolov et al. (2009) investigaram a atividade antiviral do AU e seus derivados contra o vírus influenza A/California/07/09 (H1N1) pdm09. Os resultados demonstraram que AU oxidado apresenta uma alta atividade inibitória e uma baixa citotoxicidade, e esta seletividade foi maior dentre todos os derivados do AU testados. Estudos anteriores como o de Campanella et al. (2002), serviram como evidência indireta do mecanismo de atividade antiviral do ácido úsnico e seus derivados contra o vírus influenza, em que o alvo foi a síntese do RNA viral.

Shtro et al. (2014) investigaram a atividade antiviral com novos derivados através da conjugação com outros grupos químicos como pirazólios, aminoácidos etc. Derivados de AU conjugados com aminoácidos, desde que não seja de cadeia longa apresenta um aumento da atividade antiviral. A conjugação com grupos pirazólios reduziram a citotoxicidade e também aumentaram a atividade antiviral. A forma enantiomérica do AU (-) foi mais ativa para a inibição da replicação viral do que aquela promovida pelo AU (+).

2.2.1.2.5 Atividade Antiparasitária

Wu et al. (1995) demonstraram que o AU(-) exerce um forte efeito contra o *Trichomonas vaginalis in vitro*.

Fournet et al. (1997) demonstraram que a administração intralesional de AU em camundongos BALB/c infectados com formas promastigotas de *Leishmania amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. donovani* produz uma importante redução de lesões cutâneas.

De Carvalho et al. (2005) demonstraram o efeito do AU do líquen *Cladonia substellata* Vainio sobre o *Tripanossoma cruzi in vitro* através de um estudo ultraestrutural em que foram observadas alterações tanto na forma tripomastigota quanto na epimastigota e os resultados apontaram que o AU pode ser um potencial agente quimioterápico contra a doença de Chagas.

Shang et al. (2014) demonstraram a ação acaricida do AU e de um dos seus derivados o usnato de sódio em coelhos infectados com ácaros (*Psoroptes cuniculi*). O usnato de sódio apresentou uma atividade acaricida maior do que o AU.

Si et al. (2016) demonstraram o efeito do AU e de lipossomas de AU sobre *Toxoplasma gondii in vitro*, através do uso dos corantes *Trypan blue* e *Giemsa*. Os resultados sugerem que o AU e os lipossomas de AU são agentes promissores para tratamento da toxoplasmose.

2.2.1.2.6 Toxicologia

Os efeitos adversos mais conhecidos relacionados ao uso de medicamentos são irritação local, dermatite de contato, às vezes acompanhada por conjuntivite. A dermatite de contato foi considerada relativamente incomum e a sensibilidade aos componentes do líquen foi de fraca a moderada. A sensibilidade pode também ser desenvolvida pela exposição a perfumes, loção pós-barba, desodorantes, protetor solar, cosméticos e cremes antissépticos contendo ácido úsnico e outros produtos liquênicos (INGÓLFSDÓTTIR, 2002). Utilizado como suplemento alimentar (Lipokinetix[®]), o AU pode causar hepatotoxicidade, levando ao quadro de insuficiência hepática aguda, através da indução do fator de necrose em hepatócitos isolados de ratos do tipo *Wistar*, devido a inibição da função mitocondrial e esse estudo foi realizado por Han et al. (2003).

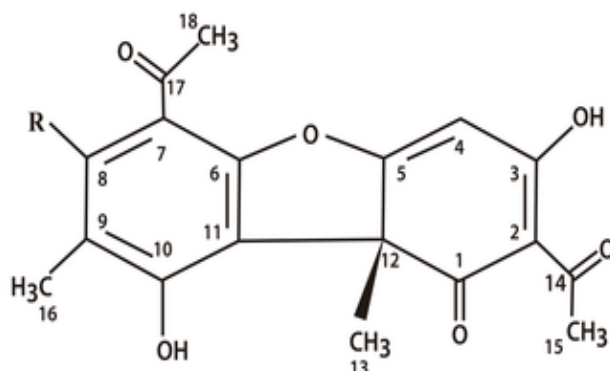
2.2.2 Usnato de potássio

O usnato de potássio ou sal de potássio (PS-UA) derivado do AU isolado da *Cladonia substellata* Vainio, constitui o produto de uma reação ácido-básica caracterizada pela presença de anéis benzeno (caráter fenólico), grupos cetonas e anel furano ligado aos anéis benzeno, com destaque para o radical K^+ localizado no carbono 8 (ARAÚJO et al., 2018).

2.2.2.1 Análise química do usnato de potássio

O PS-UA foi obtido pela retirada do átomo de hidrogênio do grupo hidroxila no Carbono 8 e realizada a inserção de um átomo de potássio, transformando-o em um sal solúvel (**Figura 8**).

Figura 8: Estrutura química do ácido úsnico. R= OH –ácido úsnico;
R= OK –usnato de potássio



Fonte: Martins, 2014.

2.2.2.2 Atividades biológicas do usnato de potássio

As atividades biológicas do PS-UA ainda são pouco conhecidas; todavia, em função de ser um derivado do AU (conhecido por sua comprovada atividade antimicrobiana dentre outras de relevada importância), alguns pesquisadores têm demonstrado forte interesse na eficácia desse derivado liquênico que se apresenta solúvel em água.

Recentes pesquisas têm demonstrado atividades específicas relacionadas ao usnato de potássio como, moluscicida contra a *Biomphalaria glabrata* (MARTINS et al., 2014); a atividade esquistossomicida contra o *Schistosoma mansoni* (ARAÚJO et al., 2019) e segundo Yang et al (2018) foi mostrado ação inibitória sobre a invasão e metástases de câncer colorretal.

2.3 ESTUDO PROTEÔMICO DE LEISHMANIA

A proteômica representa um conjunto de técnicas que permite aumentar nosso conhecimento sobre a célula baseando-se na identificação e quantificação de proteínas em diferentes condições sendo a eletroforese bidimensional (2D), uma das ferramentas para estudar a expressão de proteínas em larga escala (THIEL; BRUCHHAUS, 2001). A análise das

proteínas utilizando 2D envolve a separação sistemática, identificação e quantificação de muitas proteínas simultaneamente a partir de uma única amostra e é complementada pela espectrometria de massas (ME) para identificação das proteínas (ZHAO; JENSEN, 2009; PAGEL et al., 2015).

A abordagem proteômica aplicada ao estudo dos padrões de expressão das proteínas oferece a possibilidade de atribuir funções potenciais para essas proteínas como novos marcadores de diagnóstico, candidatos a vacinas e/ou potenciais alvos de drogas (DRUMMEL SMITH et al., 2003; PAAPE et al., 2010; CHENIK et al., 2016).

No presente estudo, além de avaliarmos a atividade leishmanicida e citotoxicidade foi realizado um estudo proteômico das formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* tratadas com usnato de potássio, comparando com as formas promastigotas não tratadas, visando detectar e identificar as proteínas diferencialmente acumuladas, e assim procurar elucidar os possíveis mecanismos de ação deste fitofármaco sobre o parasita.

3 MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 OBTENÇÃO DO MATERIAL LIQUÊNICO

O AU, metabólico secundário da espécie *Cladonia substellata* Vainio foi extraído, purificado e modificado estruturalmente para usnato de potássio no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal da Pernambuco. Foram obtidos na forma de um pó liofilizado, o ácido úsnico e seu derivado (Usnato de Potássio). O AU foi isolado a partir de 75 g do talo da *C. substellata* Vainio, que foi triturado e submetido à extração somente com éter dietílico em aparelho de Soxhlet a 40°C por 72 horas; em seguida foi concentrado até a secura em rotaevaporador acoplado a banho-maria a 40°C. Para purificação da substância, o extrato etéreo foi fracionado em coluna de sílica gel (porosidade 70-230 Mesh) e eluída com sistema de solvente clorofórmio: n-hexano (80:20 v/v) conforme metodologia de Odabasoglu et al.(2006).

A transformação da molécula do AU em PS-UA foi obtida com o AU parcialmente dissolvido em água destilada a 40°C e com a adição de hidróxido de potássio a 10%, pH 11. A amostra foi congelada em freezer (-80°C) e posteriormente liofilizada de acordo com Asahina e Shibata, 1954.

A análise da estrutura foi feita através da ressonância magnética nuclear de prótons e espectrofotometria de infravermelho. O AU foi solubilizado em dimetilsulfóxido (DMSO) e o usnato de potássio com água deionizada, ambos foram armazenados a 4°C até o momento de serem utilizados nos ensaios propostos.

3.2 MANUTENÇÃO DA CEPA DE *Leishmania infantum chagasi*

As formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* ou *L. infantum chagasi* (cepa MHOM/BR2000/Merivaldo2) foram cedidos pelo Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto

do Departamento de Microbiologia do Centro de Pesquisa Aggeu Magalhães da FIOCRUZ. Os parasitas foram mantidos em meio LIT (*Liver Infusion Broth*) suplementado com 20% de soro fetal bovino (SFB) (LGC Biotechnology Ltda.), 0,1 % de antibióticos (estreptomicina e penicilina) e 0,2% de hemina, mantidas a 26°C em estufa de BOD.

3.3 MANUTENÇÃO DE MACRÓFAGOS MURINOS (RAW 264.7)

Os macrófagos da linhagem RAW 264.7 foram cultivados em garrafas de culturas de células de 25 cm² com meio DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle's Medium*, Sigma), suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB) e 0,1% de mistura de antibióticos (penicilina e estreptomicina), a 37° C em estufa de 5% de CO₂.

3.4 BIOENSAIOS

Todos os experimentos foram repetidos três vezes, de forma independente, e cada amostra foi analisada em quadruplicata.

3.4.1 Avaliação da atividade leishmanicida do usnato de potássio

Para a determinação da IC₅₀ (concentração capaz de inibir em 50% o número de parasitos em cultura), os ensaios foram realizados através do método colorimétrico do MTT [3-{4,5-dimetiltiazol-2-il}-2,5-difenil tetrazólio], que permite medir o metabolismo celular. Esse ensaio baseia-se na redução deste sal por ação da succinato-desidrogenase mitocondrial, promovendo a formação dos cristais de formazan, cuja produção é proporcional ao número de células metabolicamente ativas. (MOSMAN, 1983).

O AU foi dissolvido em DMSO e o PS-UA em água deionizada obtendo-se uma solução estoque de 10.000 µg/mL e 20.000 µg/mL, respectivamente. Em seguida foi realizada uma diluição seriada com o meio LIT a 20% em concentrações decrescentes de 100 a 0,195 µg/mL, tendo a anfotericina B como controle positivo e como

controle negativo o DMSO a 0,25%. Em cada poço, foram adicionadas 2×10^6 parasitas/mL de formas promastigotas e completando o volume para 100 μ L por poço. As placas foram incubadas em BOD a 26° C por 72 h de incubação. Após 72 h de incubação foi adicionado 25 μ L do MTT (Sigma) a 5 mg/mL em todos os poços e a placa foi incubada por três horas à 37° C na estufa ao abrigo da luz. Após este período, foi retirado todo o sobrenadante e adicionado 100 μ L de DMSO, deixando a placa em repouso por 30 min. Foi realizada a leitura em um espectrofotômetro (Varioskan Flash) em densidade óptica (D.O) de comprimento de onda de 585nm.

3.4.2 Ensaio de citotoxicidade em macrófagos RAW 264.7

Nos ensaios de citotoxicidade celular foram utilizados macrófagos de linhagem (RAW 264.7) mantidos em meio DMEM completo. A citotoxicidade foi determinada através do método colorimétrico do MTT. A suspensão celular (2×10^5 células/mL) foi distribuída em placas com 96 poços (225 μ L em cada poço), que foram incubadas por 24 horas em estufa a 37°C em 5% de CO₂. Após a incubação e retirada das células não aderidas por aspiração, foi adicionado 25 μ L/poço das substâncias testes (ácido úsnico e usnato de potássio) em concentrações decrescentes de 50 – 0,097 μ g/mL e retorno para a estufa. Após 72 horas foi adicionado em cada poço, 25 μ L de MTT seguindo-se mais 3 horas em estufa a 37°C em 5% de CO₂. Posteriormente, o meio de cultura e o MTT foram aspirados e em seguida, 100 μ L de DMSO foram adicionados a cada poço para a dissolução de cristais Formazan. As leituras ópticas foram realizadas em um espectrofotômetro (Varioskan Flash) no comprimento de onda de 595 nm.

3.5 ANÁLISE MORFOLÓGICA DE PROMASTIGOTAS DE *L. infantum chagasi*

3.5.1 Microscopia invertida com contraste de fase

A morfologia das células foi avaliada através de sistema vídeo-microscopia, com o

auxílio do microscópio invertido com contraste de fase (LEICA), acoplado a uma câmera (MOTICAM 2.000 de 1,2 Mega Pixel) e para captura das fotomicrografias utilizou-se o software Motic Images Plus 2.0 ML instalado em um computador.

3.5.2 Microscopia Eletrônica de Varredura (MEV)

As formas promastigotas, foram centrifugadas 1200 rpm por 10min e lavadas 2x com PBS. O fixador utilizado foi o Karnovsky composto de glutaraldeído 3% e formaldeído 4%. Os parasitas aderiram em lamínulas revestidas com poli-L-lisina (Sigma). Após as referidas etapas o material foi submetido à desidratação em série crescente de etanol e à secagem pelo método do ponto crítico usando CO₂ líquido (Balzers Union Critical Point Dryer). A montagem do material em suporte metálico foi realizada com auxílio de uma fita adesiva de dupla face. As amostras foram metalizadas durante um minuto em uma atmosfera de ouro de aproximadamente 0,1 mbar, no aparelho de metalização Fine-coat Íon-Sputer e foram levadas para análise no microscópio de varredura (JEOL JSM 5600LV).

3.5.3 Microscopia Eletrônica de Transmissão (MET)

As amostras foram fixadas com o fixador karnovsky (3% de glutaraldeído e formaldeído 4%). Após a fixação, foram lavadas com tampão cacodilato de sódio 0,1M, pH 7,4 e pós-fixadas com 1% tetróxido de ósmio (OsO₄) por 2 h na ausência de luz. Em seguida, as amostras foram lavadas, contrastadas em bloco com acetato de uranila a 5%. A desidratação foi feita em séries crescentes de acetona para posterior infiltração e emblocamento em resina Epon 812 (*Electron Microscopy Sciences*). Depois de cortado e contrastado com acetato de Uranila a 5%, por 30 minutos e citrato de chumbo 1%, por 10 minutos, o material foi analisado no MET 100CXII JEOL.

3.6 ANÁLISE PROTEÔMICA

3.6.1 Cepas de *Leishmania*

As formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* foram mantidas em meio Schneider (Sigma, St.Louis, MO, USA), suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF, Sigma), 20 mM L-glutamina, 200 UI/mL de penicilina, e 100 µg/mL de estreptomicina em pH 7,2 e colocadas em estufa de BOD a 26°C. Todos os experimentos foram realizados com parasitos na fase logarítmica de crescimento. Foram utilizados dois grupos: um tratado com usnato de potássio na concentração de 6,25 µg/mL e um grupo não tratado (controle). Três culturas independentes de cada grupo foram obtidas, centrifugadas, lavadas com PBS, lisadas pelo método de maceração com nitrogênio líquido e armazenadas a -20°C para a preparação do extrato proteico.

3.6.2 Preparação do extrato proteico

A extração proteica das formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/Merivaldo2) do grupo tratado e não tratado para as eletroforeses unidimensional (1D) e bidimensional (2D) seguiu o protocolo de precipitação TCA/acetona (DAMERVAL et al.,1986) combinado com a solubilização das proteínas pelo método ureia-tiourea (RABILLOUD et al.,1997). Foi realizado um processo de lise (ciclos de congelamento/descongelamento) das formas promastigotas do parasito dos grupos tratados e não tratados (2×10^7 e $0,8 \times 10^7$ parasitas, respectivamente), através do nitrogênio líquido, adicionando-se neste extrato um inibidor de proteases e logo depois foram centrifugados. Os *pellets* foram ressuspensos com solução ureia-tiourea (7 M:2 M). O extrato proteico foi armazenado em freezer (-80°C) até o uso.

3.6.3 Quantificação das proteínas

As amostras solúveis foram quantificadas através do protocolo de quantificação (BRADFORD, 1976) que utiliza o *Coomassie brilliant blue* G-250 como reagente de coloração e a albumina de soro bovino (BSA) para estabelecimento da curva padrão. Partiu-se de 10 µL das amostras proteicas e 2 mL do reagente de Bradford para serem analisadas em espectrofotômetro de luz visível (Bioespectro SP-220) a 595 nm. As concentrações proteicas foram calculadas através da interpolação dos valores obtidos com uma curva padrão de BSA ($R_2 \geq 0,95$). As amostras foram armazenadas a -80° C até o momento de uso.

3.6.4 Eletroforese unidimensional

Os extratos proteicos foram acompanhados por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo protocolo estabelecido (LAEMMLI, 1970) em gel com 12,5% de acrilamida com a utilização de tampão 25 mM de Tris base, 192 mM de glicina e 0,1% (p/v) de SDS. Para cada amostra foi utilizada uma massa estimada de 30 µg de proteínas.

3.6.5 Eletroforese bidimensional

3.6.5.1 Focalização isoelétrica

A focalização isoelétrica (IEF) foi realizada com fita Immobiline™ DryStrip pH de 3-10, de 13 cm não linear (*GE Healthcare*) feito em triplicata com uma mistura equimolar proveniente de três culturas independentes para cada um dos grupos estudados (tratados e não tratados). Foram aplicadas 400 µg (250 µl) de proteínas totais das amostras nas fitas de acrilamida desidratada dissolvidas em solução de ureia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 2% (m/v), 19,4 mM de DTT, anfolinas 0,5% (v/v) e azul de bromofenol 0,005% (m/v). Após a reidratação das fitas (*overnight*, na temperatura de 4 a 8°C) a

focalização isoeétrica foi realizada no dispositivo IPGphor III Isoelectric Focusing Unit (*GE Healthcare*) à temperatura de 20° C, por 5 horas. As fitas foram focalizadas em gradiente de pH imobilizado, em três etapas, nas seguintes condições: 500 V - 500 V/h, 1000 V - 800 V/h, 8000 - 11300 V/h, 8000 -2900 V/h. Durante toda a focalização, foram mantidas condições constantes de corrente (200 mA) e potência (5 W). Após a focalização as fitas foram armazenadas a -20° C até a realização da eletroforese 2D.

3.6.5.2 Gel de poliacrilamida 2D (SDS-PAGE)

As fitas focalizadas foram colocadas em solução de equilíbrio [Tris-HCl 50mM (pH 6,8), uréia 6M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (m/v) e azul de bromofenol 0,005% (m/v)] em dois processos consecutivos, um de redução e outro de alquilação. As fitas foram submetidas à solução de equilíbrio contendo 1% de Ditioneitol (DTT) por 15 minutos, e posteriormente submetidas à uma nova solução de equilíbrio contendo 2,5% de iodoacetamida (IAA) pelo mesmo período. A eletroforese 2D foi realizada no aparelho Multiphor II Electrophoresis Unit (*GE Healthcare*) em gel de acrilamida de 12,5%. As fitas IPG foram transferidas para o gel de acrilamida e seladas com solução de agarose (agarose e azul de bromofenol em um tampão tris-glicina). A primeira fase da eletroforese ocorreu a 30 mA e 300 V por 15 min, depois a 80 mA e 300 V por 30 min. A segunda fase foram 2 horas a 100 mA e 300 V.

3.6.5.3 Coloração dos géis

Após a eletroforese, os géis foram mergulhados em solução fixadora (etanol 40%, ácido acético 10%) por 30 min sob agitação constante. Após o descarte da solução fixadora, os géis foram corados com uma solução de azul de *Coomassie brilliant blue* G-250 por 24 horas. O gel foi descorado após quatro lavagens seguidas com água deionizada por 15 min, 45 min e duas vezes por 2 horas. Após as lavagens, os géis foram armazenados em solução de preservação (ácido acético a 5%).

3.6.5.4 Obtenção e análise de imagens

Os géis 1D e 2D foram digitalizados no equipamento ImageScanner III (*GE Healthcare*) por meio do programa LabScan 6.0 (*GE Healthcare*). As análises dos géis foram realizadas pelo software *ImageMaster 2D platinum* 7.0 para identificar os índices de correlação entre as imagens. Por meio do programa foi realizado a detecção e seleção dos *spots*, manchas coradas e delimitadas presentes nos géis (2D), no qual foram obtidas as informações sobre os *spots*, como sua localização no gel, o ponto isoeletrico (pI), a massa molecular (MW) e porcentagem de volume (% vol). Os géis foram comparados entre si e entre os grupos não tratados e tratados com PS-UA. Foram selecionados os *spots* que apresentavam variação significativa $\text{Ratio} \geq 1,5$ e $\text{ANOVA} \leq 0,05$, sendo os mesmos considerados como proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs). Os *spots* que apresentaram mais de 50 % de redução ou de maior acúmulo foram manualmente excisados do gel para serem submetidos à digestão por tripsina.

3.6.5.5 Digestão dos spots

Foram realizadas as excisões dos peptídeos detectados (*spots*) nos géis bidimensionais em fragmentos de aproximadamente 1 mm de diâmetro com o auxílio de bisturi e acondicionados em minitubos. Os fragmentos de géis foram descorados em solução de bicarbonato de amônio 50 mM em acetonitrila a 50% por 18 horas. Após essa etapa, os géis foram lavados em 200 μL de água deionizada filtrada e desidratados duas vezes com 200 μL de acetonitrila (100 %) por cinco minutos. Posteriormente, a solução foi removida e os minitubos ficaram abertos dentro do fluxo laminar por 20 minutos a temperatura ambiente para evaporação da acetonitrila. Após a evaporação, foram adicionados 10 -15 μL (até cobrir o fragmento do gel) de solução com 20 ng/ μL de tripsina para digestão das proteínas e as amostras foram incubadas em gelo por 30 min. Depois da reidratação, foi adicionada solução de bicarbonato de amônio 50 mM cobrindo todo o

fragmento de gel, e a digestão mantida a 37°C por 16 h. Após este período, foram acrescentados 20-30 µL (até cobrir o fragmento de gel) de solução de extração [5 % de ácido trifluoroacético (TFA) em 50 % de acetonitrila], incubada por uma hora a 37°C. Os minitubos foram centrifugados e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Este procedimento foi realizado duas vezes, totalizando duas extrações. O sobrenadante de cada *spot* e banda foi concentrado a vácuo (Speed-vac, Eppendorf) e armazenado no freezer -20°C até a realização das análises por espectrometria de massas.

3.6.5.6 Espectrometria de massas (MS)

Os espectros que contém a informação relativa à massa molecular dos peptídeos oriundos da digestão enzimática (*Peptide Mass Fingerprint* - PMF) foram obtidos em espectrômetro AutoFlex III MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), baseado na ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI/TOF). Os peptídeos digeridos foram eluídos em 10 µL de solução de 0,3 % do trifluoroacético (TFA). Posteriormente, os peptídeos foram aliquotados e eluídos em solução de matriz (1 % ácido α -ciano-4- hidrocínâmico) na proporção 1:1. As análises foram realizadas de acordo com os parâmetros do método reflexivo (RP_Proteomics), excluindo-se da análise íons com razão massa carga (m/z) menor que 700 Da.

3.6.5.7 Identificação das proteínas

Os *spots* proteicos de interesse foram extraídos do gel e submetidos à digestão conforme a literatura (SHEVCHENKO et al.,2007). Os peptídeos digeridos foram analisados por espectrometria de massas (MALDI TOF/TOF). Os espectros gerados foram analisados no programa FlexAnalysis (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) para determinação das massas resultantes. A identificação das proteínas foi realizada por meio de busca no banco de dados do software MASCOT.

3.6.5.8 Análise das informações

Os espectros gerados pelo sequenciamento dos peptídeos de cada amostra foram processados e analisados pelo programa MASCOT. Para a busca na base de dados do programa foram selecionados alguns parâmetros que estão especificados na Tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros para busca de dados a partir dos espectros do MALDI TOF	
Banco de dados	<i>Leishmania, Trypanosoma e Swissprot</i>
Taxonomia	<i>Leishmania infantum; Leishmania brasiliensis; Trypanosoma cruzi; Trypanosoma Brucei e outros alveolatas</i>
Enzima	Tripsina
Número de clivagens perdidas	1
Modificações fixas	Carbamidomethyl (C)
Modificações variáveis	Oxidação (M)
Tolerância dos fragmentos	0,1 a 1,2 Da
Instrumento	<i>Bunker Diagnostics</i>

A identificação dos espectros e a correlação de possíveis similaridades com proteínas presentes em bancos de dados foram realizadas automaticamente pelo programa MASCOT. Quando a proteína foi identificada, ele recebeu um *score* que foi obtido pelo valor negativo do logaritmo da probabilidade de valor *m/z* teórico de coincidir com o valor *m/z* experimental, portanto, quanto maior o *score*, menor é a probabilidade daquela identificação ser um evento aleatório. Os pesos moleculares e pontos isoelétricos teóricos foram sugeridos pelo banco de dados *Leishmania, Trypanosoma e Swissprot* referentes à proteína com maior homologia com cada dado experimental.

3.6.5.9 Identificação de processos biológicos associados com proteínas diferencialmente acumuladas

As sequências em formato FASTA das proteínas anotadas foram recuperadas do UniProt através da ferramenta Retrieve ID e submetidas à análise de distribuição de ontologia gênica (GO) por processo biológico. Para análise funcional, as proteínas identificadas (DAPs) foram agrupadas em categorias funcionais de acordo com as anotações dos processos biológicos obtidos dos bancos de dados do Gene Ontology (GO) e PANTHER Ontology.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

3.7.1 Análise estatística dos dados relacionados à atividades leishmanida do ácido úsnico

A análise estatística das diferenças de crescimento entre culturas tratadas e controle (IC_{50}) foi realizada pelo teste de Anova com pos-teste de Tukey, com $p < 0,05$. Os resultados foram expressos como média $\pm$ desvio padrão.

3.7.2 Análise estatística dos dados relacionados às atividades leishmanida e citotóxica do usnato de potássio

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o Origin for Windows (versão 8.2, OriginLab, EUA). Os dados dos ensaios MTT foram analisados por ANOVA two-way, seguido pelo pos-teste de Tukey, com $p < 0,05$. Os resultados foram expressos como valores médios $\pm$ desvio padrão.

3.7.3 Análise estatística dos dados relacionados ao estudo proteômico

A análise comparativa foi feita no Match Mode, a partir da sobreposição das imagens dos géis, os quais foram comparados utilizando ANOVA one-way seguida do pos-teste de Tukey com $p < 0,05$ com relação ao controle. Amostras independentes foram analisadas com a utilização do teste t de *Student*. A análise estatística foi realizada usando o programa ImageMaster 2D platinum 7.0.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ARTIGO PUBLICADO NA *THE SCIENTIFIC WORLD JOURNAL*



Intitulado:

ULTRASTRUCTURAL ANALYSIS OF LEISHMANIA INFANTUM CHAGASI PROMASTIGOTES FORMS TREATED *IN VITRO* WITH USNIC ACID

João S. B. da Luz,^{1,2,3} Erwelly B. de Oliveira,³ Monica C. B. Martins,⁴ Nicácio H. da Silva,⁴ Luiz C. Alves,⁵ Fábio A. B. dos Santos,⁵ Luiz L. S. da Silva,^{1,3} Eliete C. Silva,^{1,2,3} and Paloma L. de Medeiros,^{1,2,3}

¹Pos-Graduation Program in Pathology, Federal University of Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego 1235,

50670-901 Recife, PE, Brazil

²Pos-Graduation Program in Therapeutic Innovation, Federal University of Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego 1235,

50670-901 Recife, PE, Brazil

³Department of Histology and Embryology, Federal University of Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego 1235, 50670-901 Recife, PE, Brazil

⁴Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego 1235, 50670-901 Recife, PE, Brazil

⁵Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA) and Research Center Aggeu Magalhães, CqAM/FIOCRUZ, Federal University

of Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-901 Recife, PE, Brazil

Qualis CAPES:

Periódicos

ISSN	Título	Área de Avaliação	Classificação
1537-744X	THE SCIENTIFIC WORLD JOURNAL	FARMÁCIA	B3

Research Article

Ultrastructural Analysis of *Leishmania infantum chagasi* Promastigotes Forms Treated *In Vitro* with Usnic Acid

João S. B. da Luz,^{1,2,3} Erwelly B. de Oliveira,³ Monica C. B. Martins,⁴
Nicácio H. da Silva,⁴ Luiz C. Alves,⁵ Fábio A. B. dos Santos,⁵ Luiz L. S. da Silva,^{1,3}
Eliete C. Silva,^{1,2,3} and Paloma L. de Medeiros^{1,2,3}

¹Pos-Graduation Program in Pathology, Federal University of Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego 1235, 50670-901 Recife, PE, Brazil

²Pos-Graduation Program in Therapeutic Innovation, Federal University of Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego 1235, 50670-901 Recife, PE, Brazil

³Department of Histology and Embryology, Federal University of Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego 1235, 50670-901 Recife, PE, Brazil

⁴Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego 1235, 50670-901 Recife, PE, Brazil

⁵Laboratory of Immunopathology Keizo Asami (LIKA) and Research Center Aggeu Magalhães, CPqAM/FIOCRUZ, Federal University of Pernambuco, Avenida Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-901 Recife, PE, Brazil

Correspondence should be addressed to João S. B. da Luz; j.soaesbrito704@gmail.com

Received 31 October 2014; Revised 12 January 2015; Accepted 16 January 2015

Academic Editor: Thomas Efferth

Copyright © 2015 João S. B. da Luz et al. This is an open access article distributed under the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

Leishmaniasis is considered by the World Health Organization as one of the infectious parasitic diseases endemic of great relevance and a global public health problem. Pentavalent antimonials used for treatment of this disease are limited and new phytochemicals emerge as an alternative to existing treatments, due to the low toxicity and cost reduction. Usnic acid is uniquely found in lichens and is especially abundant in genera such as *Alectoria*, *Cladonia*, *Evernia*, *Lecanora*, *Ramalina*, and *Usnea*. Usnic acid has been shown to exhibit antiviral, antiprotozoal, antiproliferative, anti-inflammatory, and analgesic activity. The aim of this study was to evaluate the antileishmanial activity of usnic acid on *Leishmania infantum chagasi* promastigotes and the occurrence of drug-induced ultrastructural damage in the parasite. Usnic acid was effective against the promastigote forms ($IC_{50} = 18.30 \pm 2.00 \mu\text{g/mL}$). Structural and ultrastructural aspects of parasite were analyzed. Morphological alterations were observed as blebs in cell membrane and shapes given off, increasing the number of cytoplasmic vacuoles, and cellular and mitochondrial swelling, with loss of cell polarity. We concluded that the usnic acid presented antileishmanial activity against promastigote forms of *Leishmania infantum chagasi* and structural and ultrastructural analysis reinforces its cytotoxicity. Further, *in vitro* studies are warranted to further evaluate this potential.

1. Introduction

Leishmaniasis is one of the most neglected diseases that remain a public health problem worldwide, affecting approximately 12 million people in more than 98 countries, with more than 350 million people at risk and when not treated, death is expected to occur after a period of four months to one year [1, 2].

Leishmaniasis is endemic in areas of tropics and subtropics, including southern Europe, Asia, Africa, and the Americas [3–5].

Leishmania infantum chagasi, a trypanosomatid parasite, is an etiological agent of visceral leishmaniasis (VL) in the American continent and it is now admitted to be the same species causing visceral leishmaniasis in Europe and certain parts of Africa [6].

Pentavalent antimonials such as sodium stibogluconate and meglumine antimoniate have been used in the treatment of all forms of leishmaniasis for more than half a century; although the mechanism of action of pentavalent antimonial is not fully understood, it is generally accepted that the active form of the metal is the reduced form Sb (III), which can lead to serious limitations due to high toxicity and resistance to drugs [2, 7]. In addition, a major problem in antimonial chemotherapy is the emergence of clinical resistance against pentavalent antimonial drugs that has reached epidemic proportions in parts of India [8–10]. Newer drugs such as miltefosine and amphotericin B have shown promising results, but they also cause some side effects that may limit their use. In this context, the discovery of new active and promising compounds with antileishmanial potential remains essential for control and prevention of leishmaniasis [11, 12].

Several natural products with antileishmanial activity have been recently reported, including naphthoquinones, lignans, neolignans, alkaloids, flavanol, and terpenoids [13, 14], but none has reached clinical use.

Lichens synthesize over eight hundred types of metabolites [15] and depsides, depsidones, dibenzofurans, xanthenes, anthraquinones, and usnic acids are amongst the more extensively studied lichen metabolites [16]. The search for new phytochemicals with antiparasitic action emerges as an alternative to existing treatments, due to the low toxicity and cost reduction.

Some studies showed that usnic acid, secondary metabolite of the lichen *Cladonia substellata* Vainio, was initially used in the treatment of pulmonary tuberculosis [17], and there are data regarding its biological activities as antibiotic [18], antiproliferative [19], analgesic and antipyretic [20], anti-inflammatory [21], antiviral [22, 23], antifungal [24], against the parasite *Trypanosoma cruzi* [25], and an immunologic modulator [26]. In addition, its mutagenic and cytotoxic activities have been determined against normal and malignant human cells lines [27–30].

Taking into account the side effects and the resistance that pathogenic protozoan parasites develop against drugs currently used in the treatment of leishmaniasis, more attention should be given to extracts and biologically active compounds isolated from plant species commonly used in herbal medicine. Thus, in this work, we have analyzed the *in vitro* effect of usnic acid on growth and ultrastructure of *Leishmania infantum chagasi* promastigote forms.

2. Materials and Methods

2.1. Extraction of Usnic Acid. Usnic acid was isolated from the crude extract of the lichen *Cladonia substellata* Vainio, and was obtained from Dr. Nicácio Henrique da Silva at Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco. Fractionation and purification of this compound were performed as previously described [31]. A stock solution was prepared at 10 mg/mL in DMSO and stored at 4°C until use.

2.2. Parasites Culture. The strain of *Leishmania infantum chagasi* (MHOM/BR2000/Merivaldo2) was kindly provided

by Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto at Department of Microbiology of Research Center Aggeu Magalhães, FIOCRUZ. The promastigotes were routinely grown in Liver Infusion Tryptose medium (LIT) at 26°C, supplemented with 10% heat-inactivated fetal bovine serum (FBS) (LGC Biotechnology), 0.1% penicillin and streptomycin, and 0.2% hemin (Sigma).

2.3. In Vitro Antileishmanial Activity. The antileishmanial activity was assessed by the colorimetric method MTT [3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazolium] (SIGMA) that is based on the conversion of the tetrazolium salt into the colored formazan product, the concentration of which can be determined spectrophotometrically. The promastigotes were seeded (2×10^6 cells/mL) with LIT medium in 96-well microplates and incubated with 50 μ L of different concentrations of usnic acid (100 to 0.195 μ g/mL) and amphotericin B (positive control). LIT medium (50 μ L) (negative control) was also added. After 72 h of incubation with usnic acid and amphotericin B 25 μ L of MTT solution was added (5 mg/mL). After 3 h of incubation at 37°C, MTT solution was aspirated and 100 μ L DMSO was added for the solubilization of the formazan crystals. After solubilization, the absorbance was determined in a spectrophotometer at 585 nm wavelength. The results were expressed as percentage of relative viability of cells to the negative control group [32]. All the experiments were performed in triplicate.

2.4. Scanning Electron Microscopy. To evaluate parasite ultrastructural alterations by scanning electron microscopy, *Leishmania infantum chagasi* promastigotes were grown for 72 h as described in LIT-DMSO or the same medium containing 25 μ g/mL usnic acid; they were subsequently collected by centrifugation at 1500 g, washed twice in 0.1 M Phosphate buffer (pH 7.2), and fixed in a solution containing 2.5% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde, and 0.1 M T phosphate buffer. After washing twice in the same buffer, the parasites were adhered to glass slides previously coated with 0.1% poly-L-lysine for 30 min at 37°C. Subsequently, the slides were washed twice with 0.1 M phosphate buffer, postfixed in solution of OsO₄ for 1 h at room temperature, and washed twice again with 0.1 M phosphate buffer. All samples were dehydrated gradually increasing the ethanol concentrations (30–100%) and were critical point dried using CO₂, mounted on metal stubs, and coated with gold (5–30 nm) for observation in a scanning electron microscope (JEOL T-200).

2.5. Transmission Electron Microscopy. Control and treated culture promastigotes with 25 μ g/mL were harvested, at room temperature by centrifugation at 1500 g, washed twice in PBS, and fixed for 2 h at 4°C in a solution containing 2.5% glutaraldehyde, 4% paraformaldehyde, and 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2. After washing in this similar buffer, cells were postfixed for 1 h in a solution containing 1% OsO₄, 0.8% potassium ferricyanide, and 5 mM CaCl₂ in 0.1 M cacodylate buffer, pH 7.2. The cells were then dehydrated in acetone and embedded in epoxy resin. Ultrathin sections were stained

with uranyl acetate and lead citrate and examined in a Zeiss EM 109 transmission electron microscope.

2.6. Statistical Analysis. Statistical analysis of growth differences between treated and control cultures (IC_{50}) was performed using the Anova with Tukey test, with $P < 0.05$. The results were expressed as mean values $\pm$ standard deviation (S.D.).

3. Results

The antileishmanial activity was directly proportional to usnic acid and amphotericin B concentrations. Usnic acid antileishmanial activity was estimated by the IC_{50} concentration at 72 h after incubation. Usnic acid was found to exhibit a lower inhibitory activity against *Leishmania infantum chagasi* ($IC_{50} = 18.30 \pm 2.00 \mu\text{g/mL}$) than the reference drug amphotericin B ($1.36 \pm 0.067 \mu\text{g/mL}$) (Figure 1).

The analysis of scanning electron micrographs of treated parasites demonstrated that usnic acid affected the parasite surface. Morphological alterations were observed as the presence of blebs in the cell membrane and of shapes given off. No ultrastructural change was observed in promastigotes grown with LIT-DMSO for 72 h, showing the elongated normal morphology (Figures 2(a)–2(f)).

Morphological alterations of *Leishmania infantum chagasi* promastigotes treated with $25 \mu\text{g/mL}$ usnic acid were observed by transmission electron microscopy. The compound caused changes in the cytoplasm density, cell swelling, and loss of cell polarity. Changes in mitochondrial morphology were characterized by marked swelling. We also noticed an increased number of intracellular vacuoles. Blebs were observed in the plasma membrane and detached from the membrane. It was also observed that the membrane was separated from the cytoplasm and there was a higher accumulation of fat compared to controls. Nucleus was observed with presence of an electron-lucent space, when compared to the control (Figures 3(a)–3(f)).

4. Discussion

Usnic acid is the most abundant constituent of various species of lichens, including those belonging to the genus *Cladonia* and *Usnea* [33]. This compound is known to present several biological activities, acting as an antiprotozoan [34, 35] and antiparasitic [25]. Research with usnic acid *in vitro* against promastigote forms of *Leishmania* sp. demonstrated the effectiveness of usnic acid in their antileishmanial activity [35].

The concentration which inhibited 50% growth of a culture of *Leishmania infantum chagasi* promastigote forms obtained in our experiments ($18.30 \mu\text{g/mL}$) was close to that obtained by de Carvalho et al. [25] who detected an IC_{50} around $20 \mu\text{g/mL}$ for another trypanosomatid parasite (*T. cruzi*). Our results demonstrated a promising leishmanicidal activity of usnic acid against the *Leishmania infantum chagasi* promastigote forms *in vitro* when confronted with the study of Jota et al. [36] who obtained for other depsides from lichens

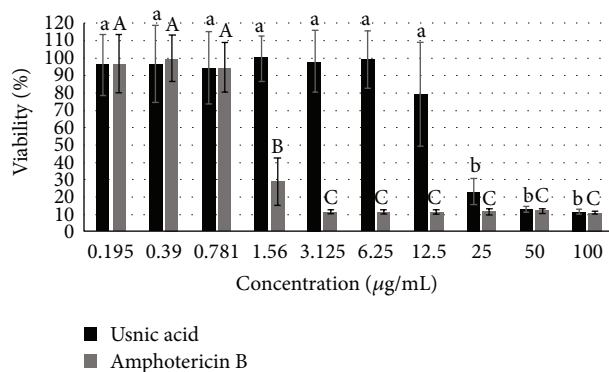


FIGURE 1: *In vitro* effects of different concentrations of usnic acid and amphotericin B on the growth of *Leishmania infantum chagasi* promastigote forms. Means followed by different letters indicating statistically significant differences according to the Anova-Tukey test ($P < 0.05$, compared to controls).

(atranorin and norstictic acid), IC_{50} values for *Leishmania infantum chagasi* at concentrations of 30 and $40 \mu\text{g/mL}$, respectively.

In a literature review conducted until October 2006 few references regarding the leishmanicidal activity of compounds isolated from lichens were found. Fournet et al. [35] revealed that among the lichen substances tested *in vitro* against promastigote forms of *L. braziliensis*, *L. amazonensis* and *L. donovani*, the usnic acid presented total lysis of parasites in the concentration of $25 \mu\text{g/mL}$. The promastigote forms of *L. amazonensis* and *L. braziliensis* under the effect of usnic acid exhibited lysis of parasites at concentration of $10 \mu\text{g/mL}$ (80–90%) and against *L. donovani* the activity was total. Already, depsidones (panarin and 1-cloropanarin) were active only in concentrations equal to or greater than $50 \mu\text{g/mL}$.

Scanning electron micrographs reveal the formation of blebs in the plasma membrane, membrane rupture, and loss of polarity. da Silva et al. [6] when using warifteine drug against promastigotes of *Leishmania infantum chagasi* found similar results in scanning microscopy, such as blebs, suggesting that usnic acid metabolism operates through a change in intracellular calcium concentration.

Comparing the ultrastructural effects of usnic acid with those produced by other drug (amiodarone), against the promastigotes and amastigotes forms of *L. amazonensis* evaluated by da Silva et al. [6], was observed similar effects on the membranes of parasites, such as lipid accumulation and loss of integrity of nuclear envelope and plasma membrane, leading to cell death by necrosis.

According to Abo-Khatwa et al. [37] usnic acid would be similar to the classical uncoupler 2, 4-dinitrophenol (DNP) oxidative phosphorylation, and thereby promote ATP depletion. Furthermore, usnic acid has lipophilic characteristics and ionizing could alter the mitochondrial membrane, causing damage of this organelle [15].

Einarsdóttir et al. [38] showed that mitochondrial membrane potential loss appears to be dose-dependent with

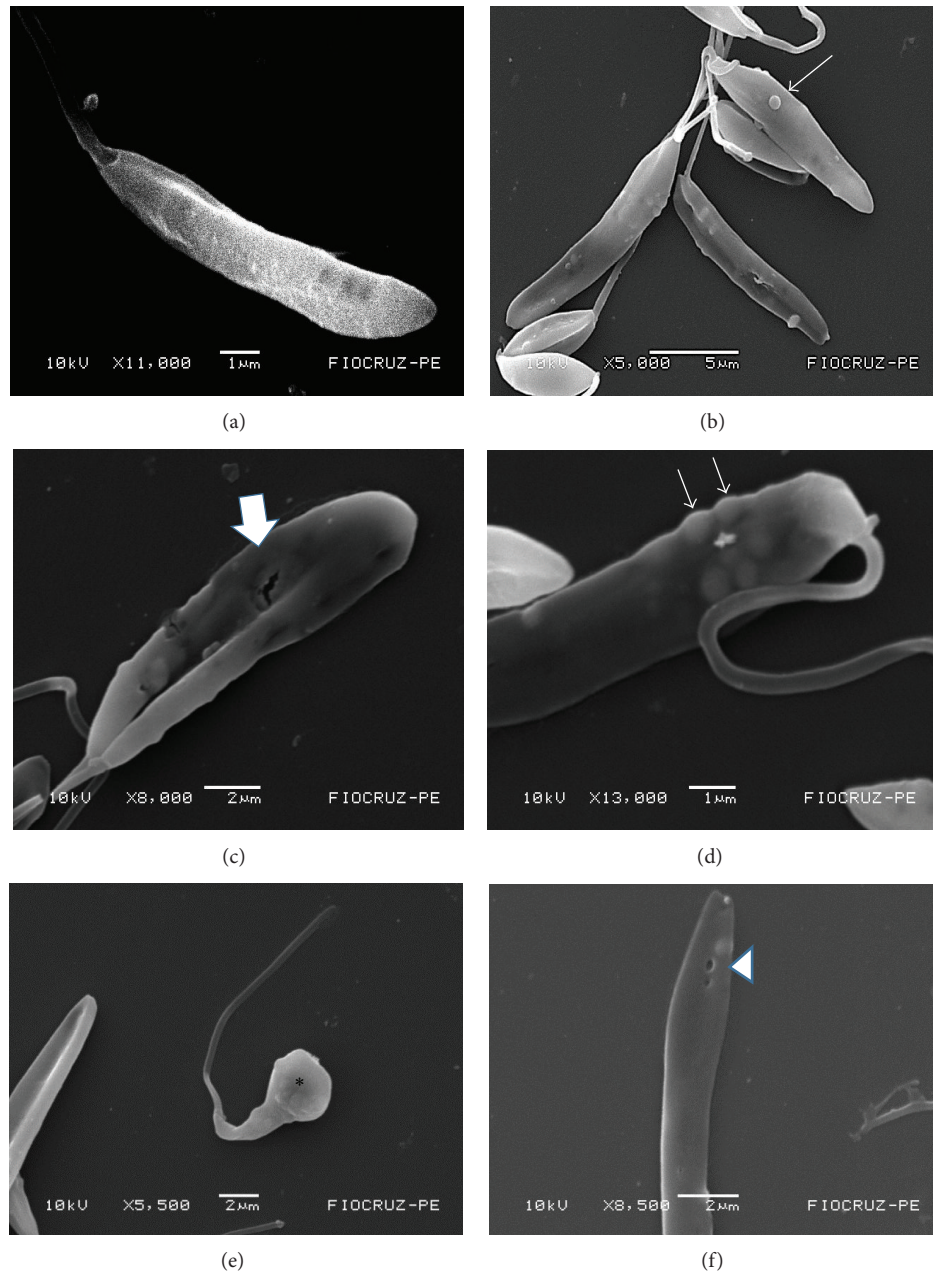


FIGURE 2: Scanning electron micrographs of *Leishmania infantum chagasi* promastigotes exposed to usnic acid. (a) Control group (no treatment); (b, c, d, e, and f) treated group usnic acid at a concentration of 25 $\mu\text{g/mL}$ for 72 hours. Blebs on the surface of promastigotes (thin arrows), membrane rupture (full arrow), swelling (asterisk), and the formation pore (arrowhead). Bars: 1 μm (a, d); 2 μm (c, e and f). Magnifications: (a) 11.000x, (b) 5.000x, (c) 8.000x, (d) 13.000x, (e) 5.500x, and (f) 8.500x.

respect to the effect of usnic acid in the two cell lines such as breast cancer T-47D and pancreatic cancer Capan-2. These data demonstrate and confirm one of the mechanisms of action of usnic acid previously cited by Müller [15], where changes in membrane lipid composition alter the physical properties with loss of mitochondrial function. We suggest, based on prior observations, that the usnic acid destabilized membranes allowing the leishmanicidal effect.

Adade and Souto-Padrón [39] studying the ultrastructures of the genera *Trypanosoma* and *Leishmania* regarding the antiparasitic drugs observed that the ultrastructural effects are similar among the various drugs used as well as between herbal medicines, including usnic acid.

The study in question was relevant to effectiveness of usnic acid in the face of *Leishmania infantum chagasi* promastigote forms, which leads us to suggest it as a possible

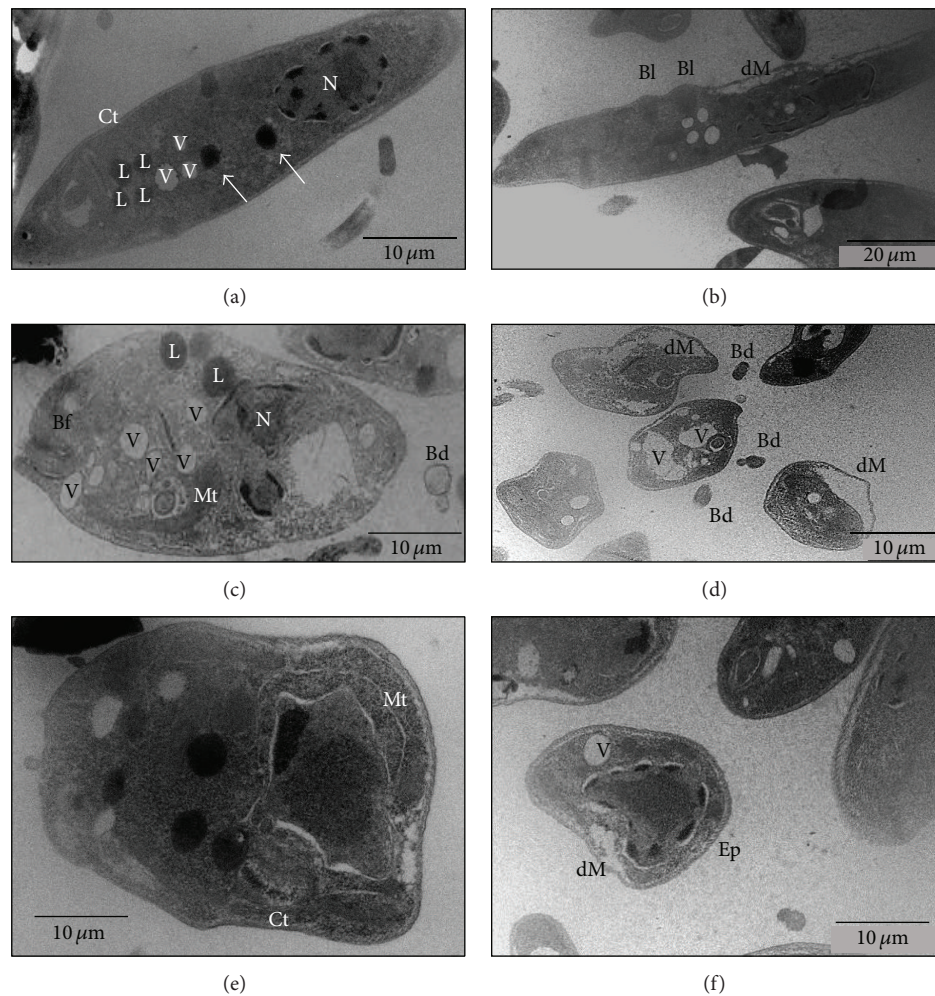


FIGURE 3: Transmission electron micrographs promastigote forms of *Leishmania infantum chagasi*. (a) Control group; (b), (c), (d), (e), and (f) treated groups (AU) at a concentration of 25 $\mu\text{g/mL}$ for 72 hours. Vacuoles (V), acidocalcisomes (arrows), nucleus (N), lipid (L), kinetoplast (Ct), flagellar pocket (Bf), mitochondrial swelling (Mt), detachment of the plasma membrane (dM), blebs (Bl), detached blebs (Bd), and electron-lucent space (Ep). Bars 10 μm (a, c, d, e, and f), Bars 20 μm (b).

phytotherapeutic agent in the treatment of visceral leishmaniasis. In this context, further studies are needed to elucidate the mechanisms of action of usnic acid and its physiological effects *in vivo*.

Conflict of Interests

The authors declare that there is no conflict of interests that could affect the impartiality of the research reported.

Acknowledgments

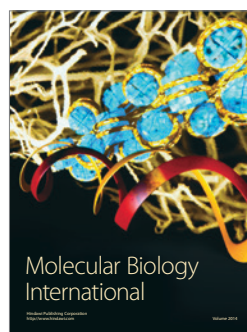
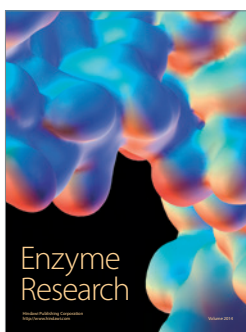
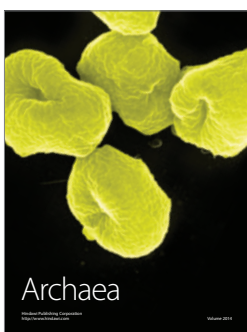
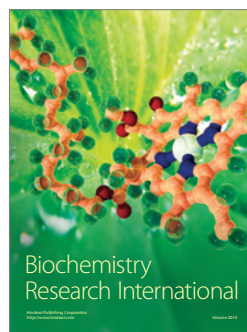
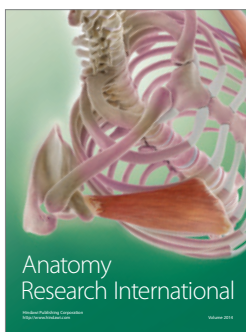
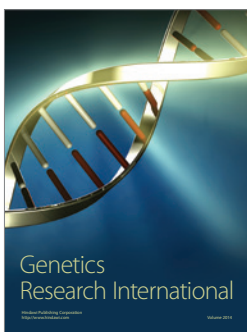
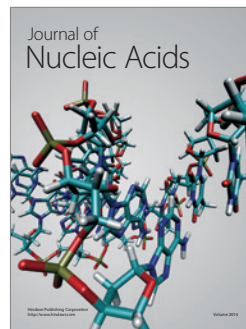
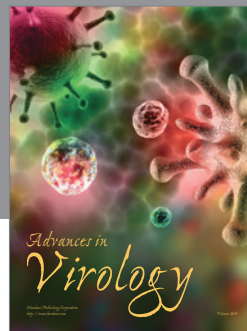
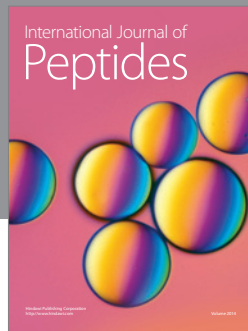
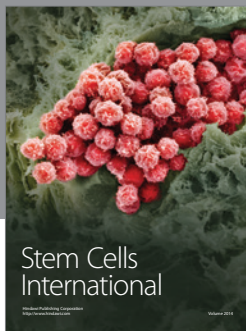
The authors like to thank the PROPESQ/UFPE, the Coordination for the Graduated Personnel (CAPES), and Aggeu Magalhães Institute/Oswaldo Cruz Foundation (CPqAM-FIOCRUZ).

References

- [1] World Health Organization, "Technical report series: control of leishmaniasis," Report of a Meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, WHO, Geneva, Switzerland, 2010, http://whqlibdoc.who.int/trs/WHO_TRS_949_eng.pdf.
- [2] C. Dos Santos Ferreira, P. Silveira Martins, C. Demicheli, C. Brochu, M. Ouellette, and F. Frézard, "Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione," *BioMetals*, vol. 16, no. 3, pp. 441–446, 2003.
- [3] J.-C. Dujardin, L. Campino, C. Cañavate et al., "Spread of vector-borne diseases and neglect of leishmaniasis, Europe," *Emerging Infectious Diseases*, vol. 14, no. 7, pp. 1013–1018, 2008.
- [4] C. M. Machado, T. C. Martins, I. Colturato et al., "Epidemiology of neglected tropical diseases in transplant recipients. Review of the literature and experience of a Brazilian HSCT center," *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, vol. 51, no. 6, pp. 309–324, 2009.

- [5] A. Pavli and H. C. Maltezou, "Leishmaniasis, an emerging infection in travelers," *International Journal of Infectious Diseases*, vol. 14, no. 12, pp. e1032–e1039, 2010.
- [6] E. C. da Silva, C. D. Rayol, P. L. Medeiros et al., "Antileishmanial activity of warifteine: a bisbenzylisoquinoline alkaloid isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae)," *The Scientific World Journal*, vol. 2012, Article ID 516408, 5 pages, 2012.
- [7] J. Chakravarty and S. Sundar, "Drug resistance in leishmaniasis," *Journal of Global Infectious Diseases*, vol. 2, no. 2, pp. 167–176, 2010.
- [8] P. L. Oliaro, P. J. Guerin, S. Gerstl, A. A. Haaskjold, J. A. Rottingen, and S. Sundar, "Treatment options for visceral leishmaniasis: a systematic review of clinical studies done in India, 1980–2004," *The Lancet Infectious Diseases*, vol. 5, no. 12, pp. 763–774, 2005.
- [9] S. L. Croft, K. Seifert, and V. Yardley, "Current scenario of drug development for leishmaniasis," *Indian Journal of Medical Research*, vol. 123, no. 3, pp. 399–410, 2006.
- [10] S. Sundar, D. K. More, M. K. Singh et al., "Failure of pentavalent antimony in visceral leishmaniasis in India: report from the center of the Indian epidemic," *Clinical Infectious Diseases*, vol. 31, no. 4, pp. 1104–1107, 2000.
- [11] F. Chappuis, S. Sundar, A. Hailu et al., "Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control?" *Nature Reviews Microbiology*, vol. 5, no. 11, pp. 873–882, 2007.
- [12] T. P. C. Dorlo, M. Balasegaram, J. H. Beijnen, and P. J. de Vries, "Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis," *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, vol. 67, no. 11, pp. 2576–2597, 2012.
- [13] A. Fournet and V. Muñoz, "Natural products as trypanocidal, antileishmanial and antimalarial drugs," *Current Topics in Medicinal Chemistry*, vol. 2, no. 11, pp. 1215–1237, 2002.
- [14] J. D. F. Inacio, M. M. Canto-Cavaleiro, and E. E. Almeida-Amaral, "In vitro and in vivo effects of (–)-epigallocatechin 3-O-gallate on *Leishmania amazonensis*," *Journal of Natural Products*, vol. 76, no. 10, pp. 1993–1996, 2013.
- [15] K. Müller, "Pharmaceutically relevant metabolites from lichens," *Applied Microbiology and Biotechnology*, vol. 56, no. 1–2, pp. 9–16, 2001.
- [16] N. K. Honda and W. Vilegas, "A química dos líquens," *Química Nova*, vol. 6, no. 21, pp. 110–125, 1998.
- [17] A. Plichet, "Usnic acid from lichens in therapy of tuberculosis," *La Presse Médicale*, vol. 63, no. 17, article 350, 1955.
- [18] M. Cocchiello, N. Skert, P. Nimis, and G. Sava, "A review on usnic acid, an interesting natural compound," *Naturwissenschaften*, vol. 89, no. 4, pp. 137–146, 2002.
- [19] M. Cardarelli, G. Serino, L. Campanella et al., "Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems," *Cellular and Molecular Life Sciences*, vol. 53, no. 8, pp. 667–672, 1997.
- [20] E. Okuyama, K. Umeyama, M. Yamazaki, Y. Kinoshita, and Y. Yamamoto, "Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*," *Planta Medica*, vol. 61, no. 2, pp. 113–115, 1995.
- [21] C. S. Vijayakumar, S. Viswanathan, M. Kannappa Reddy, S. Parvathavarthini, A. B. Kundu, and E. Sukumar, "Anti-inflammatory activity of (+)-usnic acid," *Fitoterapia*, vol. 71, no. 5, pp. 564–566, 2000.
- [22] L. Campanella, M. Delfini, P. Ercole, A. Iacoangeli, and G. Risuleo, "Molecular characterization and action of usnic acid: a drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus *in vitro* and whose main target is RNA transcription," *Biochimie*, vol. 84, no. 4, pp. 329–334, 2002.
- [23] P. Scirpa, G. Scambia, V. Masciullo et al., "Adjuvant treatment of HPV infection. A perspective and controlled study on the efficacy and safety of intravaginal administration of usnic acid and zinc sulphate compound," *Minerva Ginecologica*, vol. 51, no. 6, pp. 255–260, 1999.
- [24] P. Halama and C. van Haluwin, "Antifungal activity of lichen extracts and lichenic acids," *BioControl*, vol. 49, no. 1, pp. 95–107, 2004.
- [25] E. A. B. de Carvalho, P. P. Andrade, N. H. Silva, E. C. Pereira, and R. C. B. Q. Figueiredo, "Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* *in vitro*: an ultrastructural study," *Micron*, vol. 36, no. 2, pp. 155–161, 2005.
- [26] L. C. Santos, N. K. Honda, I. Z. Carlos, and W. Vilegas, "Intermediate reactive oxygen and nitrogen from macrophages induced by Brazilian lichens," *Fitoterapia*, vol. 75, no. 5, pp. 473–479, 2004.
- [27] F. Bucar, I. Schneider, H. Ögmundsdóttir, and K. Ingólfssdóttir, "Anti-proliferative lichen compounds with inhibitory activity on 12(S)-HETE production in human platelets," *Phytochemistry*, vol. 11, no. 7–8, pp. 602–606, 2004.
- [28] M. Mayer, M. A. O'Neill, K. E. Murray et al., "Usnic acid: a non-genotoxic compound with anti-cancer properties," *Anti-Cancer Drugs*, vol. 16, no. 8, pp. 805–809, 2005.
- [29] N. P. da Silva Santos, S. C. Nascimento, M. S. O. Wanderley et al., "Nanoencapsulation of usnic acid: improvement on the antitumour activity and reduction of hepatotoxicity," *European Journal of Pharmaceutics and Biopharmaceutics*, vol. 64, no. 2, pp. 154–160, 2006.
- [30] M.-A. Bazin, A.-C. Le-Lamer, J.-G. Delcros et al., "Synthesis and cytotoxic activities of usnic acid derivatives," *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, vol. 16, no. 14, pp. 6860–6866, 2008.
- [31] F. Odabasoglu, A. Cakir, H. Suleyman et al., "Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats," *Journal of Ethnopharmacology*, vol. 103, no. 1, pp. 59–65, 2006.
- [32] T. Mosmann, "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays," *Journal of Immunological Methods*, vol. 65, no. 1–2, pp. 55–63, 1983.
- [33] Y. Nishitoba, I. Nishimura, T. Nishiyama, and J. Mizutani, "Lichen acids, plant growth inhibitors from *Usnea longissima*," *Phytochemistry*, vol. 26, no. 12, pp. 3181–3185, 1987.
- [34] J. Wu, M. Zhang, D. Ding, T. Tan, and B. Yan, "Effect of *Cladonia alpestris* on *Trichomonas vaginalis* *in vitro*," *Chinese Journal of Parasitology & Parasitic Disease*, vol. 13, no. 2, pp. 126–129, 1995.
- [35] A. Fournet, M. E. Ferreira, A. R. de Arias et al., "Activity of compounds isolated from Chilean lichens against experimental cutaneous leishmaniasis," *Comparative Biochemistry and Physiology C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology*, vol. 116, no. 1, pp. 51–54, 1997.
- [36] V. C. S. Jota, P. P. Andrade, N. H. Silva, E. C. Pereira, R. Figueiredo, and N. K. Honda, "Análise *in vitro* de substâncias líquênicas sobre *Leishmania chagasi*," in *II Encontro do Grupo Brasileiro de Liqueólogos (EGBL-2)*, Livro de Resumo, Campo Grande, Brazil, 1998.
- [37] A. N. Abo-Khatwa, A. A. Al-Robai, and D. A. Al-Jawhari, "Lichen acids as uncouplers of oxidative phosphorylation of mouse-liver mitochondria," *Natural Toxins*, vol. 4, no. 2, pp. 96–102, 1996.

- [38] E. Einarsdóttir, J. Groeneweg, G. G. Björnsdóttir et al., "Cellular mechanisms of the anticancer effects of the lichen compound usnic acid," *Planta Medica*, vol. 76, no. 10, pp. 969–974, 2010.
- [39] C. M. Adade and T. Souto-Padrón, "Contributions of ultrastructural studies to the cell biology of trypanosomatids: targets for anti-parasitic drugs," *The Open Parasitology Journal*, vol. 4, no. 1, pp. 178–187, 2010.



4.2 MANUSCRITO A SER ENCAMINHADO PARA A PLOS ONE



Intitulado:

USNIC ACID POTASSIUM SALT: A PROMISSING METABOLITE LICHEN DERIVED FROM *Cladonia substellata* (Vainio) AGAINST *Leishmania* (L.) *infantum chagasi*

João S.B. Luz^{1*}, Erwelly B. Oliveira¹, Klewdma F. Araújo¹, Gleyka D.M. Santos¹, Mônica C.B. Martins³, Nicácio H. Silva³, Luiz C. Alves^{4,5}, Fábio A. Brayner^{4,5}, Cláudio G. Rodrigues^{1,6}, Eliete C. Silva^{1,2}, Paloma L. Medeiros^{1,2,7}

¹Postgraduation Program in Therapeutic Innovation, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

²Department of Histology and Embryology, Tissue Culture Laboratory, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

³Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

⁴Institute Aggeu Magalhães (IAM-FIOCRUZ), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

⁵Keizo Asami Immunopathology Laboratory (LIKA-UFPE), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

⁶Department of Biophysics and Radiobiology, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

⁷Postgraduation Program in Translational Health, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

Qualis CAPES:

Periódicos

ISSN	Título	Área de Avaliação	Classificação
1932-6203	PLOS ONE	FARMÁCIA	A2

USNIC ACID POTASSIUM SALT: A PROMISSING METABOLITE LICHEN DERIVED FROM *Cladonia substellata* (Vainio) AGAINST *Leishmania* (L.) *infantum chagasi*

João S.B. Luz^{1*}, Erwelly B. Oliveira¹, Klewdma F. Araújo¹, Gleyka D.M. Santos¹, Mônica C.B. Martins³, Nicácio H. Silva³, Luiz C. Alves^{4,5}, Fábio A. Brayner^{4,5}, Cláudio G. Rodrigues^{1,6}, Eliete C. Silva^{1,2}, Paloma L. Medeiros^{1,2,7}

¹Postgraduation Program in Therapeutic Innovation, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

²Department of Histology and Embryology, Tissue Culture Laboratory, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

³Department of Biochemistry, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

⁴Institute Aggeu Magalhães (IAM-FIOCRUZ), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

⁵Keizo Asami Immunopathology Laboratory (LIKA-UFPE), Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

⁶Department of Biophysics and Radiobiology, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

⁷Postgraduation Program in Translational Health, Federal University of Pernambuco, Recife, Pernambuco, Brazil

*Corresponding authors:

E-mail address: j.soaresbrito@hotmail.com (JSB) and pmedlys@gmail.com (PLM)

[¶]These authors contributed equally to this work

Abstract

Background

Leishmaniasis presented as a severe public health problem in many countries worldwide, affecting populations that are socially and economically vulnerable. The search for new phytochemicals with antiparasitic action, low toxicity and cost reduction emerges as an alternative to existing treatments. Some studies have shown that usnic acid (UA), secondary metabolite of the lichen *Cladonia substellata* Vainio presents several biological activities (antiproliferative, antiviral, anti-inflammatory, antimicrobial, and antiparasitic), even though it has still been considered very toxic because it is insoluble in water. Converting it into a salt, potassium usnate (PS-UA), and now making it water-soluble, we hope to increase its effectiveness and reduce its toxicity. In the present study aimed to analyze the leishmanicidal activity *in vitro* of PS-UA against promastigote forms of *Leishmania* (*Leishmania*) *infantum chagasi* and its toxicity for lineage macrophages (RAW 264.7), verifying how it may reflect on the morphology of these species.

Methodology/Principal findings

PS-UA was obtaining from salinization of UA that was extracted with diethyl ether isolated and purified from the lichen *Cladonia substellata* Vainio. The antiprotozoal activity of this metabolite lichen against *Leishmania infantum chagasi* was determined and the cytotoxicity *in vitro* was assessed in macrophages (RAW 264.7). PS-UA showed significant leishmanicidal activity against promastigote forms of *L. (L.) infantum chagasi* at different concentrations ($IC_{50} = 3.719 \pm 2.99 \mu\text{g/mL}$) and displayed 7- fold less toxicity to macrophages ($CC_{50} = 26.31 \pm 13.55 \mu\text{g/mL}$, IS = 7). Under effect of IC_{50} , structural and ultrastructural aspects of the parasite were analyzed. Through SEM we observed blebs on the surface of the promastigotes, membrane detachment and rounded forms. Ultrastructural alterations were observed such as nucleus with altered chromatin condensation patterns, intense cytoplasmic vacuolization, extensive mitochondrion swelling, flagellar pocket with small vesicles, lipid bodies with varied morphology and electron-dense vesicles throughout the cytoplasm, indicative of change in sterol content and additionally, and were also noted lipid rafts on the cell wall of *L. (L.) infantum chagasi* promastigotes.

Conclusion/ Significance

The solubilization of the usnic acid (UA) was important to obtain the potassium usnate (PS-UA), one metabolite of lichen with potential leishmanicidal activity and low toxicity to mammalian cells. Our results indicate that PS-UA has potent activity *in vitro* against *Leishmania (L.) infantum chagasi* promastigotes and should open possibilities as a promising agent for the chemotherapy of leishmaniasis; for this, more studies are needed to elucidate the probable mechanisms involved.

Keywords: usnic acid potassium salt; *Leishmania infantum chagasi*; antileishmanial activity.

Author summary

Leishmania (L.) infantum chagasi is the causing agent of visceral leishmaniasis in Latin America, a neglected disease that can be fatal if not treated and the options therapeutics existents remains limited. In the present study, we analyzed the leishmanicidal activity *in vitro* of usnic acid potassium salt (PS-UA) against of *L. (L.) infantum chagasi* promastigotes and its toxicity to murine macrophages (RAW 264.7), verifying how it may reflect on the morphology of these species. PS-UA showed significant *in vitro* leishmanicidal activity against these parasites at different concentrations ($IC_{50} = 3.719 \pm 2.99 \mu\text{g/mL}$) and displayed 7-fold less toxicity to macrophages ($CC_{50} = 26.31 \pm 13.55 \mu\text{g/mL}$, IS = 7). Through SEM we observed blebs on the surface of the promastigotes, membrane detachment and rounded forms. Ultrastructural alterations were observed in different organelles indicative of change in sterol content. PS-UA showed potential leishmanicidal activity and low toxicity to mammalian cells. These results reinforces the relevant effect of PS-UA as target for new drugs or vaccine development against leishmaniasis; for this, more studies are needed to elucidate the probable mechanisms involved.

Introduction

Leishmaniasis comprises a group of diseases caused by a protozoan of the genus *Leishmania*, which mainly affects people from tropical and subtropical endemic areas, including southern Europe, Asia, Africa and Latin America [1]. According to the World Health Organization, this disease has been presented as a severe public health problem in many countries worldwide, affecting mainly regions that are socially and economically vulnerable; being reported approximately 12 million people in more than 98 countries, with more than 350 million people at risk and 2 million new cases per year, with an annual mortality of approximately 60,000 cases per year, a number only overtaken by malaria among parasitic diseases [2, 3, 4].

Different species of the *Leishmania* genus can cause leishmaniasis and around the world, 21 species of *Leishmania* are associated with the occurrence of tegumentary or visceral lesions; however, *Leishmania* from the subgenus *Viannia* causes mainly tegumentary lesions and is autochthonous in the Americas [5]. Regarding the subgenus *Leishmania*, some species cause tegumentary leishmaniasis (TL) in Europe, Africa, and Asia; whereas some other species (*Leishmania (Leishmania) infantum* or *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi*) cause visceral leishmaniasis (VL) in America and Europe, and *Leishmania (Leishmania) donovani* causes VL in India and other Asian and African countries [6]. The increased incidence of leishmaniasis in developed countries broke this scenario and one of the consequences has been the emergence of the *Leishmania visceral* as an important opportunistic infection among people with human immunodeficiency virus-1 (HIV-1) infection [7]. Visceral leishmaniasis (VL) is a chronic and often lethal human and canine vector-borne disease caused by protozoa parasites of the *Leishmania* genus. In Brazil, the infection is caused by *L. (L.) infantum chagasi*. Human VL is the most severe form of the disease and is lethal if not treated early after the onset of clinic and pathological signs [8, 9]

The search for new drugs with leishmanicidal action is constant, mainly due to the high toxicity of the drugs of first choice, such as glucantime and pentamidine, besides not having the desired efficacy [10]. Considering the difficulties with the treatment of leishmaniasis and the absence of vaccines, there is an urgent need to search for new drugs, including herbal medicines and others natural sources [11, 12, 13].

Lichens, technically speaking, are not plants; instead, they are a symbiosis between one fungus (mycobiont, heterotrophic) and a green algae or cyanobacteria (photobiont, autotrophic) that produce several secondary and bioactive metabolites of pharmacological

importance [14, 15]. Usnic acid (UA) is a secondary metabolite found mainly in lichens of the genus *Cladonia* and *Usnea*, representing about 6% of the dry weight of the lichen stem, playing an important biological role, giving lichens protection against invading microorganisms, UV rays and dryness [16, 17]. Pharmacological studies have shown that UA has several biological activities as antimicrobial [18, 19], antiproliferative [20, 21], analgesic and antipyretic [22], larvicide, against larvae of *Culex pipiens* (Linnaeus) and *Culiseta longiareolata* (Macquart) [23, 24, 25], insecticidal [26], antifungal [27], antitumor [28], antioxidant [29, 30], antiparasitic [31, 32, 33], antitubercular [34] and antiviral [35, 36]. However, the therapeutic application of the UA has not been introduced, due to the low solubility and high hepatotoxicity, which in part compromises its applicability [37]. In this context, it should be noted that UA derivatives possessed better antibacterial, antitubercular, and anticancer activity than the original compound [38]. Recent studies have reported on the molluscicidal activity of usnic acid potassium salt from *Cladonia substellata* (Vainio), against *Biomphalaria glabrata* [39] and by enhanced bioavailability and inhibits invasion and metastasis in colorectal cancer [40].

In the present study, we aimed for the first time to analyze the leishmanicidal activity *in vitro* of PS-UA on promastigote forms of *Leishmania (L.) infantum chagasi* and its cytotoxic activity on RAW 264.7 macrophages, verifying how it may reflect on the morphology of these species.

Materials and Methods

Plant material

Samples of *Cladonia substellata* Vainio (1887) used in this study were collected in the municipality of Mamanguape in the state of Paraíba (Northeastern Brazil), at the margins of a Federal Highway BR-101 in August 2012 (6°08'19"S/ 35°08'11"W). Thallus of *C. substellata* (Vainio) was identified by MSc Maria de Lurdes Buril and a *voucher* specimen (Nº. 34402) was deposited in the UFPE Herbarium Geraldo Mariz from Department of Botany, Recife/PE, Brazil.

Extraction, isolation and purification of usnic acid

Initially, the air-dried parts (200 g) of the thallus of *C. substellata* were macerated and submitted to successive extractions with 150 mL of diethyl ether using a Soxhlet apparatus at 40 °C for 16 h, as described elsewhere [41]. The ether extracts were filtered and stored at

4°C for 24 h. Thereafter, these extracts were concentrated in a rotary evaporator (Flash Evaporator-115V. Buchler Instruments, Fort Lee, New Jersey, USA). The UA precipitates were collected and subjected to silica gel (70–230 mesh) column chromatography (CC) eluting with chloroform: n-hexane (80:20 v/v) as the solvent system [42].

The fractions obtained were monitored by thin-layer chromatography (TLC) and high-performance liquid chromatography (HPLC). Those samples that showed only one band were combined. The fractionation and monitoring processes were repeated until highly pure usnic acid (> 95%), that was obtained and its molecular structure was analyzed by the spectra of proton nuclear magnetic resonance (¹H NMR) and Carbon (¹³C NMR) obtained at 300 MHz in CDCl₃ (Varian UNITY spectrometer), while infrared spectroscopy (IR) analysis were performed in a Bruker Fourier transformer (model IF566) with KBr disks, also confirmed by comparing previously reported spectral data [43].

Synthesis of PS-UA

After the purification of UA (Fig 1A), 500 mg of this acid were partially dissolved in 40 mL of milli-Q water at 40 °C and subsequently sprayed with previously prepared KOH (10%) until complete solubilization of the compound at pH 11. The solution was frozen at -80 and then lyophilized [44]. The molecular structure of PS-UA was confirmed by IR spectroscopy and ¹H NMR [39].

Parasite culture

The strain of *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR2000/Merivaldo2) was kindly provided by Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto from Department of Microbiology of Institute Aggeu Magalhães (IAM-FIOCRUZ), Federal University of Pernambuco, Recife/PE, Brazil. The promastigote forms were routinely grown incubated at 26 °C in BOD incubator (Caltech Indústria e Comércio LTDA, Franca, São Paulo, Brazil), in a Liver infusion tryptose (LIT) medium, supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated fetal bovine serum - SBF (LGC Biotechnology, São Paulo, Brazil), 100 U/mL penicillin (Sigma®, St. Louis, MO, USA), and 100 µg/mL streptomycin (Sigma®, St. Louis, MO, USA), and 0.2% hemin (Sigma®, St. Louis, MO, USA).

In vitro antileishmanial activity

Antileishmanial activity was assessed by the colorimetric method MTT [45] that is based on the conversion of the tetrazolium salt into the colored formazan product, the concentration of

which can be determined spectrophotometrically. The promastigote forms were seeded (2×10^6 cells/mL) with LIT medium in 96-well microplates and incubated with 50 μ L of different concentrations of PS-UA (0.195 to 100 μ g/mL) and amphotericin B (positive control). LIT medium (50 μ L) (negative control) was also added. After 72 h of incubation with PS-UA and amphotericin B, 25 μ L of MTT solution was added (5mg/mL). After 3h of incubation at 37°C, MTT solution was aspirated and 100 μ L DMSO was added for the solubilization of the formazan crystals. Finished the solubilization, the absorbance was measured by using a multi-well scanning spectrophotometer (SkanIt Software 2.4.5 RE for Varioskan Flash, Thermo Scientific, Massachusetts, USA) at 595 nm wavelength. The results were expressed as percentage of relative viability of parasites compared to the negative control group. All the experiments were performed in quadruple in three independent experiments.

Scanning electron microscopy

To evaluate possible ultrastructural alterations on the surface of parasites was performed an observation by scanning electron microscopy (SEM). *Leishmania (L.) infantum chagasi* promastigotes were grown for 72 h in LIT medium (control) or in LIT the containing IC₅₀ of PS-UA (3,719 μ g/mL); they were subsequently collected by centrifugation at 1500 g, washed twice in 0.1M Phosphate buffer (pH 7.2), and fixed in a solution containing 2.5% (v/v) glutaraldehyde, 4% (v/v) paraformaldehyde, and 0.1M phosphate buffer for 1h at room temperature. After washing twice in the same buffer, the parasites were adhered to glass slides previously coated with 0.1% poly-L-lysine (Sigma Aldrich, USA) for 30 min at 37°C. Subsequently, the slides were washed twice with 0.1M phosphate buffer, post-fixed in solution of OsO₄ for 1h at room temperature and washed twice again with 0.1M phosphate buffer. All samples were dehydrated gradually increasing the ethanol concentrations (30 - 100% v/v) and were critical point dried using CO₂, mounted on metal stubs, and coated with gold (5 -30 nm) for 15s. The samples were then examined through SEM (JEOL T-200).

Transmission electron microscopy

Control and treated culture promastigotes with 3.719 μ g/mL of PS-UA (IC₅₀) were harvested, at room temperature by centrifugation at 1.500 g, washed twice in PBS, and fixed for 2h at 4°C in a solution containing 2.5% (v/v) glutaraldehyde, 4% (v/v) paraformaldehyde, and 0.1M cacodylate buffer, pH 7.2, for 1h at room temperature. After being washed in the same solution, they were post-fixed for 1h in dark conditions in a solution containing 1% OsO₄,

0.8% potassium ferricyanide, and 5mM CaCl₂ in 0.1M cacodylate buffer, dehydrated in acetone, and embedded in epoxy resin. Ultrathin sections were picked up on uncoated 200-mesh copper grids, stained with uranyl acetate and lead citrate, and observed in a Zeiss 900 or Jeol JEM 100CX Electron Microscope.

Culture of RAW 264.7

RAW 264.7, a murine macrophages cell line, was maintained in the Tissue Culture Laboratory of Histology and Embryology Department (DHE-UFPE, Recife/PE, Brazil), at 37°C in an incubator containing 5% CO₂ and 95% of relative humidity, in DMEM (Sigma[®], St. Louis, MO, USA) supplemented with 10% (v/v) heat-inactivated FBS (LGC Biotechnology, São Paulo, Brazil), 100 IU penicillin/mL and 100 µg/mL streptomycin (Sigma[®], St. Louis, MO, USA, respectively). RAW 264.7 cells, grown in culture bottles (1 x 10⁶ cells/mL) until reached 80-90%. Thereafter, these cells were transferred to 96-well plates (concentration: 2 x 10⁵ cell/mL) under conditions already reported.

Cytotoxicity assay using murine macrophages and determination of morphological changes

RAW 264.7 macrophages (2 x 10⁵ cells/mL) was seeded in 96-wells plates and incubated for 72h with PS-UA at concentrations ranging from 0,079 to 50µg/mL. After the exposure period, the cytotoxicity was determined using the MTT assay [45]. The formation of formazan crystals was measured by adding 20 µL de MTT (5mg/mL) to each well and the cells were incubated at 37°C in the dark for 3h. After this time, all supernatant was discarded and subsequently the formazan crystals were dissolved in DMSO (100 µL), the plates were stirred for 15 min and subsequently read at 595 nm using a scanning spectrophotometer (SkanIt Software 2.4.5 RE for Varioskan Flash, Thermo Scientific, Massachusetts, USA). The selectivity index (SI = CC₅₀/IC₅₀) was calculated by ratio of toxicity to macrophages *versus* toxicity to parasites after 72 h incubation. All the experiments were performed in triplicate, in three independent experiments.

Morphological changes of these cells after treatment with PS-UA (varying the concentrations) were detected with 72 hours. RAW 264.7 macrophages were observed by an inverted phase contrast microscope LEICA (Leica microsystems, Wetzlar, Germany) equipped with digital camera (MOTICAM BA 2.000, Campinas, Brazil) and the digital photographs were taken using the Motic Images Plus 2.0 software.

Statistical Analysis

All statistical analyses were performed with Origin software (version 8.2, OriginLab, USA). Data from MTT assays were analyzed by two-way ANOVA followed by post-hoc Tukey's test, with $p < 0.05$. The results were expressed as mean values $\pm$ standard deviation (SD).

Results

Antileishmanial Activity

The evaluation of leishmanicidal activity was performed against promastigotes forms *Leishmania (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR2000/Merivaldo2). The mean value of IC₅₀ for PS-UA and amphotericin B was 3.71 ± 2.99 and 2.00 ± 1.47 $\mu\text{g/mL}$ (respectively), these averages were statistically different (Fig 1B). These data show that PS-UA presented a performance close to the standard drug in terms of efficiency against promastigote forms of *Leishmania (L.) infantum chagasi* (Fig 1B).

Scanning electron microscopy of *L. (L.) infantum chagasi* promastigotes under action of PS-UA

Cell morphology was markedly different under effect of IC₅₀ of PS-UA (Fig 1C). Scanning electromicrographs of *L. (L.) infantum chagasi* promastigotes revealed loss of the elongated form of the parasites, membrane detachment with presence of blebs in the surface and, some bodies with tumefied aspect and reduction of flagellum (Fig 1C).

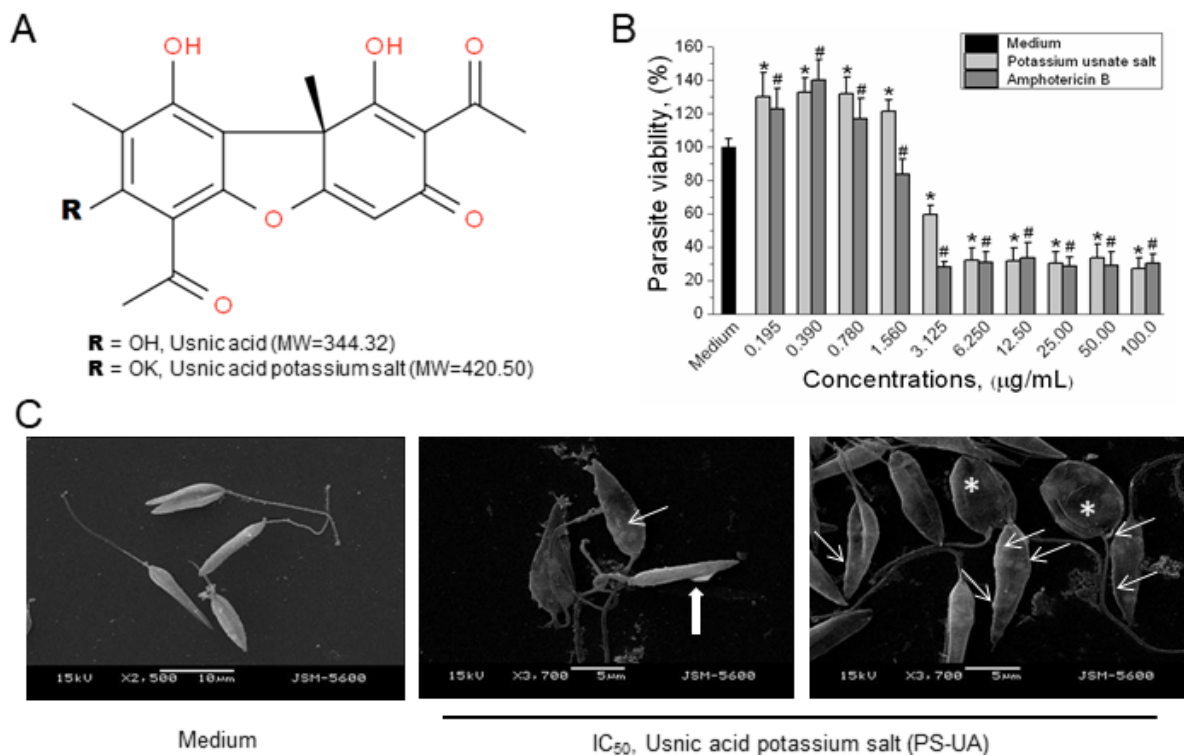


Figure 1. A) Chemical structure: R= OH, Usnic acid (MW= 344.32) or R= OK, Usnic acid potassium salt (MW= 420.50). B) *In vitro* effect of PS-UA on the growth of *Leishmania (L.) infantum chagasi* promastigotes. The growth of promastigote forms (2×10^6 cells/mL) cultured at 26°C in LIT medium (control negative) and in the presence of PS-UA or amphotericin B (positive control) assayed in concentrations ranging from 0.195 to 100 μg/mL. The results were expressed as percentage of relative viability of parasites compared to control groups. The data shown are the mean $\pm$ SD and all the experiments were performed in quadruple of three independent experiments. C) Scanning electromicrographs of promastigote forms of *L. (L.) infantum chagasi*. Control group (medium, without treatment): noted parasites with elongated bodies, stable surface and long flagellum. Groups treated with 3.71 μg/mL of PS-UA for 72 hours: blebs are noted on the surface of the promastigotes (thin arrows), membrane detachment (full white arrow) and, some bodies with tumefied aspect and reduction of flagellum (asterisk). Magnitude: x 2500 (10 μm) and x 3700 (5 μm).

Effect of PS-UA on the ultrastructure of *L. (L.) infantum chagasi* promastigotes

Cell morphology was markedly different under effect of IC₅₀ of PS-UA when compared with control group (Fig 2A and 2B). The ultrastructural analysis of *L. (L.) infantum chagasi* promastigotes showed that PS-UA (IC₅₀) induced changes in such as (Fig 2C, 2D, 2E and 2F): nucleus with altered chromatin condensation patterns, intense cytoplasm vacuolization, extensive mitochondrion swelling with loss of mitochondrial cristae and vesiculation of the inner mitochondrial membrane, flagellar pocket with small vesicles, lipid bodies with varied morphology and electron-dense vesicles were visualized throughout the cytoplasm, indicative of change in sterol content. Additionally, were also noted lipid rafts on the cell wall of *L. (L.) infantum chagasi* promastigotes (Fig 2E and 2F).

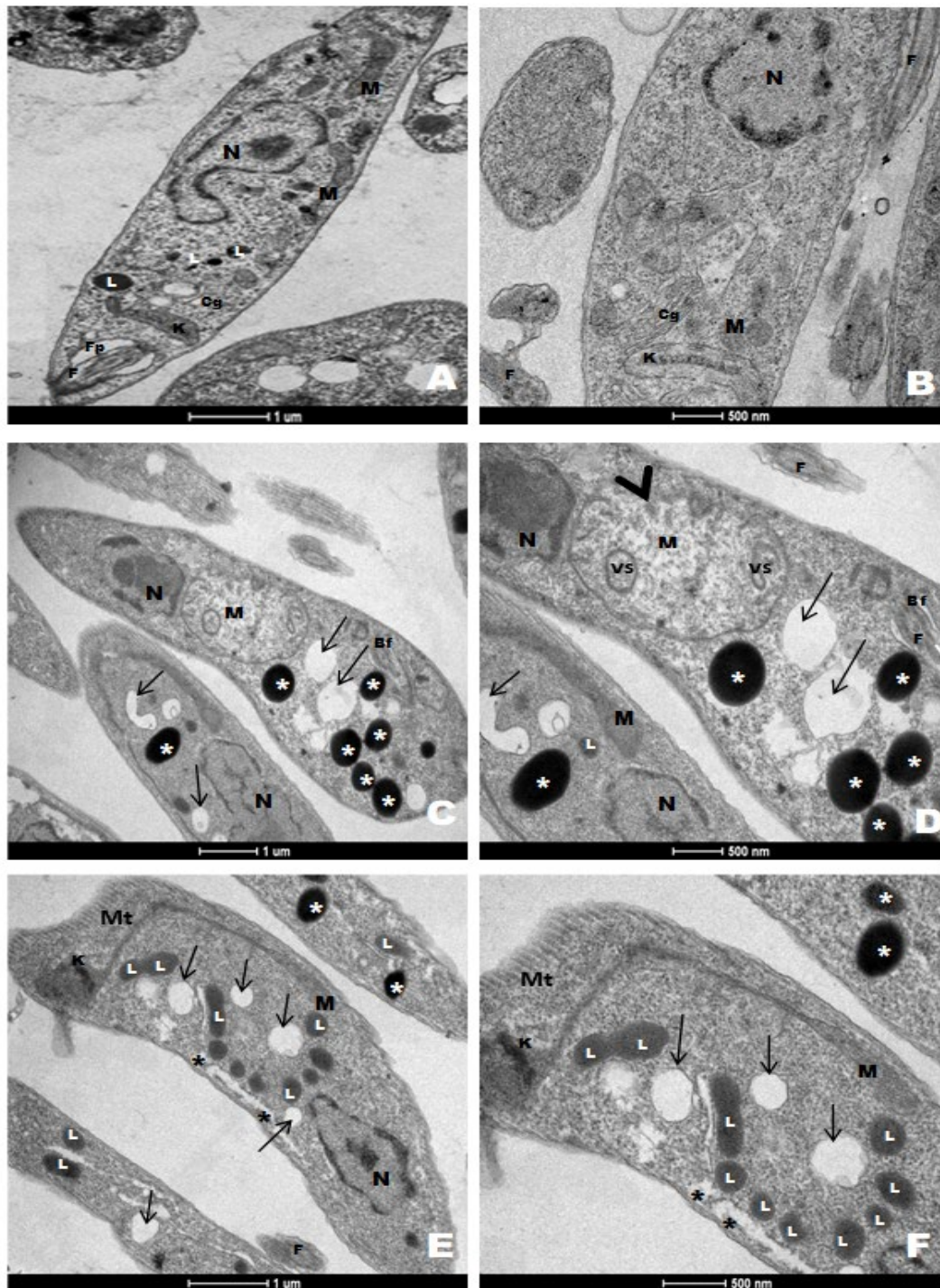


Figure 2. Transmission electron microscopy of *Leishmania (L.) infantum chagasi* promastigotes incubated in the absence (A and B) or presence of potassium usnate at IC₅₀ (C-F). A, B) Parasites displaying normal morphology and intracellular structures as nucleus (N), mitochondria (M), atypical vesicles into mitochondrion (vs), kinetoplast (K), microtubules (Mts), flagellar pocket (Fp), flagellum (F), Golgi complex (Cg) and lipid bodies (L). C, D, E and F) *L. (L.) infantum chagasi* promastigotes treated with IC₅₀ (3,71 µg/mL) of PS-UA showing structures with changes: nucleus with altered chromatin condensation patterns, intense cytoplasm vacuolization (fine arrows), extensive mitochondrion swelling with loss of mitochondrial cristae and vesiculation of the inner mitochondrial membrane (arrowhead), flagellar pocket with small vesicles (white arrow), lipid bodies with varied morphology (L) and electron-dense vesicles were visualized throughout the cytoplasm (white asterisks), indicative of change in sterol content. Additionally, in E and F (enlarged image), were noted lipid rafts on the cell wall. Scale bars = 1 µm (A, C and E) and 500 nm (B, D and F).

Evaluation of cytotoxic activity and morphological changes of RAW 264.7 macrophages under the effect of PS-UA

Under effect of PS-UA, at different concentrations (0,079 to 50 µg/mL), the viability of RAW 264.7 macrophages was not impaired up to a concentration of 3.125 µg/mL (detected by MTT-test after 72 h) and began to decrease from 6.25 µg/mL (Fig. 3A). The CC₅₀ determination (26.31 ± 13.55) confirmed the low cytotoxicity of PS-UA.

Toxicity study of the tested compound on macrophage allows us to evaluate its selectivity index (SI = 7). The selectivity index (SI) was calculated as $SI = CC_{50}/IC_{50}$ for *L. (L.) infantum chagasi* promastigotes.

Morphological evaluation of RAW 264.7 macrophages revealed control cells with normal shape and were attached to the culture plate (Fig 3B). Groups exposed to high doses of PS-UA (25 and 50 µg/mL) presented morphological changes that included: cells became small, round and increased evidence of cellular injury and debris (Fig 3B).

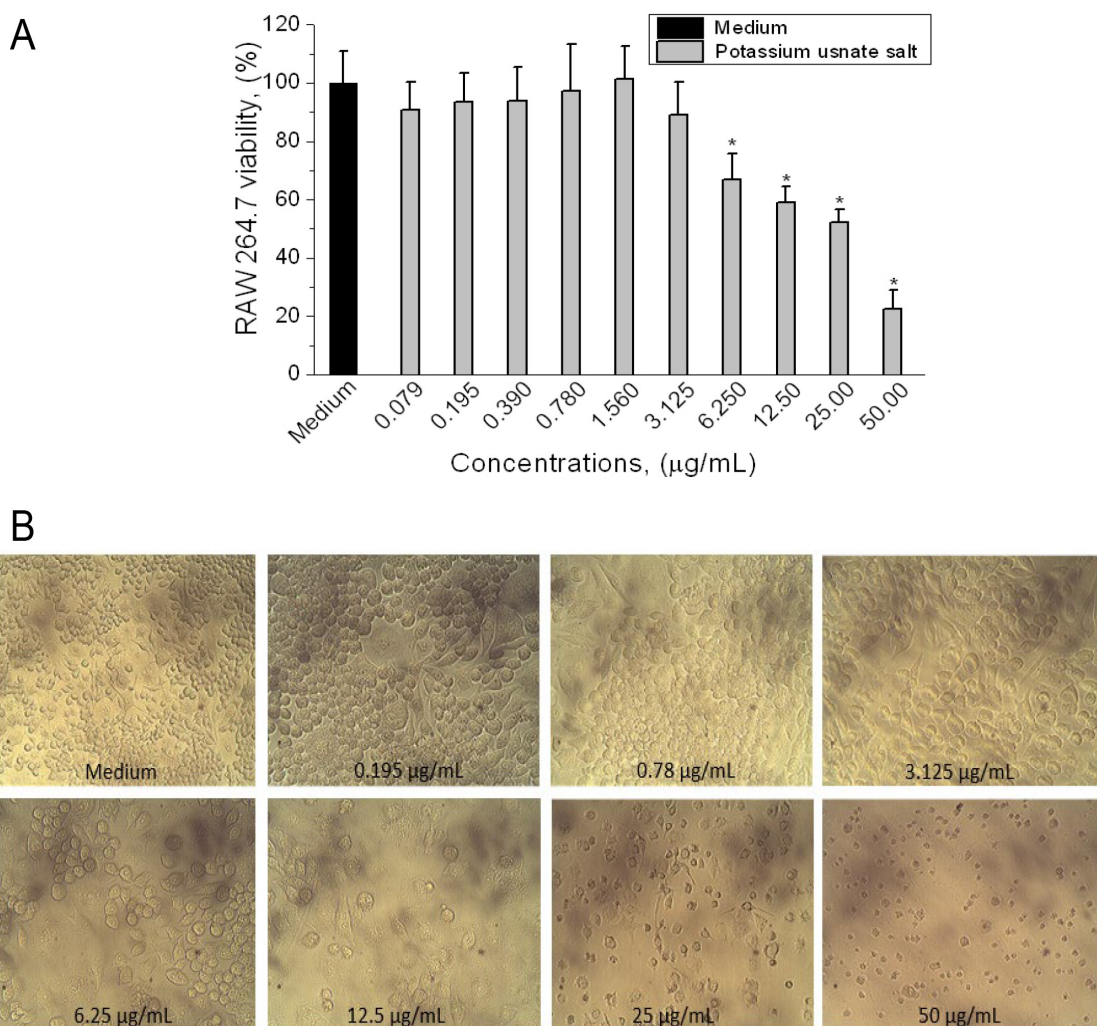


Figure 3. **A)** *In vitro* cytotoxic activity and morphological changes of RAW 264.7 macrophages under the effect of potassium usnate salt at 72h. Cytotoxic effect (CC_{50}) of PS-UA was determined at concentrations ranging from 0.079 to 50 $\mu\text{g/mL}$. Statistical analysis of growth differences between treated and control cultures (CC_{50}) were performed using the ANOVA with Tukey test ($p < 0.05$). The results were expressed as mean values $\pm$ standard deviation (SD). **B)** Morphology changes of RAW 264.7 cells induced by PS-UA treatment for 72 h observed by an inverted phase contrast microscope. Cells treated (concentrations ranging from 0.079 to 50 $\mu\text{g/mL}$) were compared with untreated cells (control), magnitude of images 400x. Control cells control cells were presented with normal shape, attached to the culture plate. Groups exposed to high doses of PS-UA (25 and 50 $\mu\text{g/mL}$) presented with increased evidence of cellular injury and debris.

Discussion

Lichens are a world-widespread consortium of fungal and photosynthetic partners. Among these, the usnic acid is one of the most common and abundant lichen metabolites, well known as an antibiotic, but also endowed with several other interesting properties such as antiinflammatory, antimicrobial, antiviral, antioxidant, antiprotozoan and anticancer properties [46, 47, 48]. Although the UA has been incorporated for years in cosmetics, perfumery and traditional medicines, however its application was withdrawn due to acute liver toxicity reported with chronic consumption [38].

In order to contribute for discovery of new ant leishmanial agents, in the present study we first describe the leishmanicidal activity of PS-UA against promastigote forms of *Leishmania (L.) infantum chagasi*. The results obtained from MTT assay demonstrated that treatment with PS-UA significantly inhibited these parasites *in vitro* with an IC_{50} value (3.71 $\mu\text{g/mL}$) very close to that found for the amphotericin B (2.00 $\mu\text{g/mL}$). This distinct response to PS-UA treatment may result from salinization of UA to enhance its water solubility, mentioned by some researchers as the main reason for UA's unsatisfactory performance.

Previous studies carried out by our group, demonstrated the leishmanicidal activity of UA against *L. infantum chagasi* promastigotes, where the IC_{50} obtained in our experiments was 18.30 $\mu\text{g/mL}$ [49]. Similar results were also reported by other researchers, who evaluated UA toxicity *in vitro* against the *Trypanosoma cruzi* ($IC_{50} = 40$ or 80 $\mu\text{g/mL}$) and *Plasmodium falciparum*, the causative agent of malaria, having been determined the efficacy of UA with different dose-dependent concentrations [50].

The valuable property of UA activity against protozoa has been the focus of several surveys, since the source of antiprotozoal drugs is very limited, and the licensed pharmaceuticals are highly toxic [51]. In this context, the PS-UA appears as a strategy that can be used, because it is soluble in water, without losing its biological potential [52, 53, 54]. Recently, was first reported the *in vitro* effect of PS-UA against adult worms of *Schistosoma*

mansoni, confirmed by a detailed ultrastructural analysis and this potential result was attributed to the K⁺ counterion located on carbon 8 of the molecule, conferring the hydrophilic characteristic responsible for many of its bioactive effects [55].

As we have shown a potential leishmanicidal activity with the IC₅₀ of PS-UA, we carried out the analysis by electronic microscopy to verify morphological changes in *L. (L.) infantum chagasi* promastigotes. Scanning electron microscopy (SEM) shows significant alterations such as loss of the elongated form of the parasites which presented themselves with spherical shapes, detachment membrane with presence of blebs on the surface, body with swollen appearance and reduction of flagella. Our results are in accordance with others studies that reported destabilization of the tubulin-dependent cytoskeleton, since both the body shape of the parasite and the integrity of the flagellum is highly dependent on the stability of the microtubules [56, 57]. The microtubules (Mts) of the trypanosomatid subpellicular corset are connected to each other and to the plasma membrane and represent the major the major cytoskeletal components of theses parasites [58, 59].

The subpellicular microtubules of the trypanosome cytoskeleton are very regularly spaced and individual microtubules are linked to each other and to the plasma membrane by a series of cross-bridges, where the proteins involved in these connections have been called of microtubule associated proteins (MAPs) [60]. Previous reports demonstrate that important cytoskeleton modifications appear during the *Leishmania* death [61]. Taking these findings into consideration, the mechanism of action of PS-UA may be the key to explaining the relationship between the Mts rearrangement, changes in cell volume and the transition from an elongated to a spherical promastigote form. Considering the volume variation observed by SEM, essentially the transport systems to *L. (L.) infantum chagasi* probably are directly accessible to exogenous inhibitors or toxic substrates, as mentioned by other authors [62].

Ultrastructural effects of PS-UA on the promastigote forms of *L. (L.) infantum chagasi* were detected as early as 72 h after initiating the treatment and most of these parasites presented remarkable swelling of the mitochondrion, with internal mitochondrial membrane formed vesicles [63]. It has also been suggested that the presence of ergosterol and analogues is essential for the maintenance of a normal structural organization, especially of the inner mitochondrial membrane in trypanosomatids [64]. Biochemical studies have shown that the mitochondrial membrane of trypanosomatids is rich in endogenous and exogenous sterols, in contrast to mammalian cells where the mitochondrion is devoid of sterols [65, 66]. The presence of vacuoles was very prominent, and these may be associated with entry of substances by simple diffusion, caused by increased permeability of the membrane due to the

PS-UA. This compound can be probably involved in the breakdown and recycling of abnormal membrane structures, suggesting an intense process of remodeling of intracellular organelles irreversibly damaged due the instability of its membranes [67].

The fact that *Leishmania* parasites have adapted to not only survive, but to proliferate probably is due to the protection conferred by specialized molecules on the parasite's cell surface. One of the major glycoconjugates synthesized by the parasite is lipophosphoglycan (LPG), a heterogeneous, lipid-containing polysaccharide, which is considered the major surface molecule of *Leishmania* promastigotes and has been implicated in a surprisingly large number of functions that may contribute to the virulence in various species of this parasite, especially by its ability to chelate calcium ion [68]. In this context, it has been reported that the disruption of the intracellular Ca^{2+} homeostasis represents an important object for the action of drugs in trypanosomatids. [69]

In order to observe routes that can clarify the possible mechanism of action of the PS-UA, we detected by MET changes in morphology membrane due the instable of subpellicular microtubules (Mts) that modified the lipid rafts at parasite wall. Previous reports demonstrate that both the macrophages and the parasites present lipid rafts at their cell wall, which are rich in cholesterol [70]. Thus, for its low cytotoxicity and selectivity towards cholesterol-rich lipid rafts, PS-UA could be selected as a new therapeutic for the treatment of pathogens that require cholesterol for their infectiveness.

PS-UA showed no cytotoxicity to mammalian cells (murine macrophages) having a high degree of selectivity to *L. (L.) infantum chagasi* promastigotes. In this context, further studies will be needed to elucidate the probable mechanisms of action PS-UA and its physiological effects *in vivo*.

Conclusions

In this work, we observed that usnic acid potassium salt potassium, a promising metabolite of lichen derived from *Cladonia substellata* (Vainio), presented potent activity *in vitro* against *Leishmania (L.) infantum chagasi* promastigotes and low toxicity to mammalian cells. These results reinforces the potential effect of this lichen derived as target for new drugs or vaccine development against leishmaniasis; for this, more studies are needed to elucidate the likely mechanisms involved.

Supporting information

S1 Fig. Panel were generated in Adobe Photoshop CC 2019 using the PSD file format

S2 Fig. Panel were generated in Adobe Photoshop CC 2019 using the PSD file format

S3 Fig. Panel were generated in Adobe Photoshop CC 2019 using the PSD file format

Acknowledgments

We would like to thank Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto from Department of Microbiology of Institute Aggeu Magalhães (IAM-FIOCRUZ, Recife/PE) by kindly providing the strain of *L. (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR2000/Merivaldo2).

Author Contributions

Conceptualization: João S. B. Luz, Eliete C. Silva, Paloma L. Medeiros.

Data curation: João S. B. Luz, Paloma L. Medeiros.

Formal analysis: João S. B. Luz, Cláudio G. Rodrigues, Eliete C. Silva, Paloma L. Medeiros.

Funding acquisition: João S. B. Luz, Eliete C. Silva, Paloma L. Medeiros.

Investigation: João S. B. Luz, Erwelly B. Oliveira, Klewdma F. Araújo, Gleyka D. M. Santos, Cláudio G. Rodrigues, Eliete C. Silva, Paloma L. Medeiros

Methodology: João S. B. Luz, Erwelly B. Oliveira, Klewdma F. Araújo, Gleyka D. M. Santos, Mônica C.B. Martins, Nicácio H. Silva, Luiz C. Alves, Fábio A. Brayner, Cláudio G. Rodrigues, Eliete C. Silva, Paloma L. Medeiros.

Resources: João S.B. Luz, Eliete C. Silva, Paloma L. Medeiros.

Supervision: João S.B. Luz, Eliete C. Silva, Paloma L. Medeiros.

Validation: João S.B. Luz, Eliete C. Silva, Paloma L. Medeiros.

Writing – original draft: João S.B. Luz, Paloma L. Medeiros.

Writing – review & editing: João S.B. Luz, Cláudio G. Rodrigues, Eliete C. Silva. Paloma L. Medeiros.

References

1. World Health Organization. Control of the leishmaniasis: report of a meeting of the WHO Expert Committee on the Control of Leishmaniasis, Geneva 22-26, 2010. WHO Technical Report Series. 949. Available: http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/44412/1/WHO_TRS_949_eng.pdf
2. Pace D. Leishmaniasis. J Infect. 2014; 69(suppl.1):S10-S18. <https://doi.org/10.1016/j.jinf.2014.07.016>
3. Hotez PJ, Molyneux DH, Fenwick A, Kumaresan J, Sachs SE et al. Control of Neglected Tropical Diseases. N Engl J Med. 2007; 357:1018-1027. <https://doi.org/10.1056/NEJMra064142>
4. World Health Organization. Leishmaniasis in high-burden countries: an epidemiological update based on data reported in 2014. Wkly Epidemiol Rec. 2016; 91: 285–296. PMID: [27263127](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27263127/)
5. Goto H, Lauletta Lindoso JA. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis. Infect Dis Clin North Am. 2012; 26(2):293-307. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.001>
6. van Griensven J, Diro E. Visceral leishmaniasis. Infect Dis Clin North Am. 2012; 26(2):309-322. <https://doi.org/10.1016/j.idc.2012.03.005>
7. Hurissa Z, Gebre-Silassie S, Hailu W, Tefera T, Lalloo DG, Cuevas LE, et al. Clinical characteristics and treatment outcome of patients with visceral leishmaniasis and HIV coinfection in northwest Ethiopia. Trop Med Int Health. 2010; 15: 848-855. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3156.2010.02550.x>
8. Gontijo CMF, Melo MN. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. Rev Bras Epidemiol. 2004; 7(3): 338-349. <http://dx.doi.org/10.1590/s1415-790X2004000300011>
9. Romero GA, Boelaert M. Control of visceral leishmaniasis in Latin America - a systematic review. PLoS Negl Trop Dis. 2010; 4(1):e584. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000584> PMID: [20098726](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20098726/)
10. Kaye P, Scott P. Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface. Nat Rev Microbiol. 2011; 11(9):604-615. <https://doi.org/10.1038/nrmicro2608> PMID: [21747391](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21747391/)
11. Bezerra JL, Costa GC, Lopes TC, Carvalho ICDS, Patrício FJ, Sousa SM et al. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. Rev. Bras. Farmacogn. 2006; 16(suppl.): 631-637. <https://doi.org/10.1590/s0102-695X2006000500008>.
12. Oryan A. Plant-derived compounds in treatment of Leishmaniasis. Iran J Vet Res. 2015; 16(1):1-19. PMID: [27175144](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27175144/)

13. Medicinal plants from the Brazilian Amazonian region and their antileishmanial activity: a review. J Integr Med. 2018; 16(4): 211-222. <https://doi.org/10.1016/j.joim.2018.04.04> PMID: 29691188
14. Yousuf A, Choudhary MI, Atta-Ur-Rahman. Lichens: chemistry and biological activities. Stud Nat Prod Chem. 2014; 43:223-259. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63430-6.00007-2>
15. Calcott MJ, Ackerley DF, Knight A, Keyzers RA, Owen JG. Secondary metabolism in the lichen symbiosis. Chem Soc Rev. 2018; 47:1730-1760. <https://doi.org/10.1039/c7cs00431a>
16. Ingólfssdóttir K. Molecules of interest usnic acid. Phytochem. 2002; 61(7): 729-736. PMID: 12453567
17. Cocchietto M, Skert N, Nimis PL, Sava GA. Review on usnic acid, an interesting natural compound. Naturwissenschaften. 2002; 89: 137-146. PMID: 12061397
18. Wu J, Zhang M, Ding D, Tan T, Yan B. Effect of *Cladonia alpestris* on *Trichomonas vaginalis* in vitro. Chinese J. Parasitol & Parasit Dis. 1995; 13: 126–129. PMID: 7554162
19. Martins MCB, Lima MJG, Silva FP, Azevedo-Ximenes E, Silva NH, Pereira EC. *Cladia aggregata* (lichen) from Brazilian Northeast: chemical characterization and antimicrobial activity. Bras Arch Biol Technol. 2010; 53:115-122. <https://doi.org/10.1590/s1516-89132010000100015>
20. Cardarelli M, Serino G, Campanella L, Ercole P, De Cicco Nardone F, Alesiani O et al. Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems. Cell. Mol. Life Sci. 1997; 53: 667-672. PMID: 9351470
21. Ivanova V, Backor M, Dahse HM, Graefe U. Molecular structural studies of lichen substances with antimicrobial, antiproliferative, and cytotoxic effects from *Parmelia subrudecta*. Prep Biochem Biotechnol. 2010; 40(4):377-388. <https://doi.org/10.1080/10826068.2010.525432>
22. Okuyama E, Umeyama K, Yamazaki M, Kinoshita Y, Yamamoto Y. Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*. Planta Medica. 1995; 61: 113–115. <https://doi.org/10.1055/s-2006-958027>. PMID: 7753915
23. Cetin H, Tufan-Cetin O, Turk AO, Tay T, Candan M, Yanikoglu A et al. Insecticidal activity of major lichen compounds, (-)- and (+)-usnic acid, against the larvae of house mosquito, *Culex pipiens* L. Parasitol Res. 2008; 102:1277–1279. <https://doi.org/10.1007/s00436-008-0905-8>
24. Bomfim RR, Araújo AA, Cuadros-Orellana S, Melo MG, Quintans-Junior LJ, Cavalcanti SC, et al. Larvicidal activity of *Cladonia substellata* extract and usnic acid against *Aedes aegypti* and *Artemia salina*. Latin Ame J of Pha. 2009; 28(4):580-584. ISSN 0326-2383
25. H. Cetin , O. Tufan-Cetin , A.O. Turk , T. Tay , M. Candan , A. Yanikoglu & H. Sumbul (2012) Larvicidal activity of some secondary lichen metabolites against the

mosquito *Culiseta longiareolata* Macquart (Diptera: Culicidae), Nat Prod Res, 26:4, 350-355. <https://doi.org/10.1080/14786411003774296>

26. Nimes PL, Skert N. Lichen chemistry and selective grazing by the Coleopteran *Lasioderma serricorne*. Environ Exp Bot. 2006; 55 (1-2): 175-182. <https://doi.org/10.1016/j.envexpbot.2004.10.011>

27. Wei X, Jeon HS, Han KS, Koh YJ, H JS. Antifungal activity of Lichen-forming fungi against *Colletotrichum acutatum* on hot pepper. Plant Pathol J. 2008; 24(2): 202-206. <https://doi.org/10.5423/PPJ.2008.24.2.202>

28. Einarsdóttir E, Groeneweg J, Björnsdóttir G, Hardardóttir G, Omarsdóttir S, Ingólfssdóttir K et al. Cellular mechanisms of the anticancer effects of the lichen compound usnic acid. Planta Med. 2010; 76(10): 969-974. <https://doi.org/10.1055/s-0029-1240851>. PMID: 20143294

29. Halici M, Odabasoglu F, Suleyman H, Cakir A, Aslan A, Bayir Y. Effects of water extract of *Usnea longissima* on antioxidant enzyme activity and mucosal damage caused by indomethacin in rats. Phytomedicine. 2005; 12(9):656-662. <https://doi.org/10.1016/j.phymed.2004.06.021>. PMID: 16194053

30. White PAS, Oliveira RCM, Serafini MR, Araújo AAS, Gelain DP, Moreira JCF et al. Antioxidant activity and mechanisms of action of natural compounds isolated from Lichens: a systematic review. Molecules. 2014; 19:14496-14527. <https://doi.org/10.3390/molecules190914496>

31. De Carvalho EAB, Andrade PP, Silva NH, Pereira EC, Figueiredo RCBQ. Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* in vitro: an ultrastructural study. Micron. 2005; 36(2):155-161. <https://doi.org/10.1016/j.micron.2004.09.003>. PMID: 15629646

32. Shang X, Miao X, Lv H, Wang D, Zhang J, He H, Yang Z, Pan H. Acaricidal activity of usnic acid and sodium usnic acid against *Psoroptes cuniculi* in vitro. Parasitology Research. 2014; 113(6):2387-2390. <https://doi.org/10.1007/s00436-014-3910-0>

33. Si K, Wei L, Yu X, Wu F, Li X, Li Cheng CY. Effects of (+)-usnic acid and (+)-usnic acid-liposome on *Toxoplasma gondii*. Exp Parasitol. 2016; 166:68-74. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2016.03.021>. PMID: 27004468

34. Rogoza LN, Salakhutdinov NF, Tolstikov GA. Antituberculosis activity of natural and synthetic compounds. Chem Sustain Dev. 2010; 18: 343-375. UDC: 547.944

35. Scirpa P, Scambia G, Masciullo V, Battaglia F, Foti E, Lopez R et al. A zinc sulfate and usnic acid preparation used as post-surgical adjuvant therapy in genital lesions by Human Papillomavirus. Minerva Ginecol. 1999; 51(6): 255-260. PMID: 10479878

36. Campanella L, Delfini M, Ercole A, Iacoangeli E, Risuleo G. Molecular characterization and action of usnic acid a drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus in vitro and whose main target is RNA transcription. Biochim. 2002; 84(4): 392-334. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(02\)01386-X](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(02)01386-X) PMID: 12106911

37. Luzina OA, Salakhutdinov NF. Biological activity of usnic acid and its derivatives: Part 2. Effects on higher organisms: Molecular and physicochemical aspects. Russ J Bioorg Chem. 2016; 42(3): 249-268. <https://doi.org/10.1134/s1068162016030109>
38. Luzina AO, Salakhutdinov NF. Usnic acid and its derivatives for pharmaceutical use: a patent review (2000–2017). Exp Opin Ther patents. 2018; 28(6): 477-491. <https://doi.org/10.1080/13543776.2018.1472239>
39. Martins MCB, Silva MC, Silva LRS, Lima VLM, Pereira EC, Falcão EPS et al. Usnic acid potassium salt: an alternative for the control of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). PLoS One. 2014; 9(11):e1111102. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0111102>
40. Yang Y, Bae WK, Lee J-Y, Choi YJ, Lee KW, Park MS et al. Potassium usnate, a water-soluble usnic acid salt, shows enhanced bioavailability and inhibits invasion and metastasis in colorectal cancer. Scientific Report. 2018; 8(16234):1-11. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-34709-9>
41. Asahina Y, Shibata, S. Chemistry of Lichen Substances. Japan Society for the Promotion of Science; Ueno, Tóquio. 1954. 240p.
42. Odabasoglu F, Cakir A, Suleyman H, Aslan A, Bayir Y, Halici M et al. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. J Ethnopharmacol. 2006; 103 (1): 59–65. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2005.06.043>. PMID: 16169175
43. Huneck S, Yoshimura I. Identification of lichen substances. Springer-Verlag Berlin Heidelberg. 1996; 492 p. <https://doi.org/10.1007/978-3-642-85243-5>
44. Araújo HDA, Melo AMMA, Siqueira WN, Martins MCB, Aires AL, Albuquerque MCPA et al. Potassium usnate toxicity against embryonic stages of snail *Biomphalaria glabrata* and *Schistosoma mansoni* cercariae. Acta Trop. 2018; 188: 132-137. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.08.006>. PMID: 30098309
45. Mosmann T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. J Immunol Methods. 1983; 65(1-2): 55–63. PMID: 6606682
46. Cocchietto M, Skert N, Nimis PL, Sava GA. Review on usnic acid, an interesting natural compound. Naturwissenschaften. 2002; 89(4): 137-146. <https://doi.org/10.1007/s00114-002-0305-3>
47. Araújo AAS, Melo MGD, Rabelo TK, Nunes PS, Santos SL, Serafini MR et al. Review of the biological properties and toxicity of usnic acid. Nat Prod Res. 2015; v.29, p. 2167-2180. <https://doi.org/10.1080/14786419.2015.1007455>
48. Luzina AO, Salakhutdinov NF. Biological activity of usnic acid and its derivatives: Part 1. activity against unicellular organisms. Rus J Bioor Chem. 2016; 42 (2): 115-132. <https://doi.org/10.1134/s1068162016020084v>
49. Luz JSB, Oliveira EB, Martins MCB, Silva NH, Alves LC, Santos FAB, Silva LLS, Silva EC, Medeiros PL. Ultrastructural analysis of *Leishmania infantum chagasi*

promastigotes forms treated *in vitro* with usnic acid. Sci World J. 2015; 25: 1-7. <https://doi.org/10.1155/2015/617401>

50. Alahmadi A A. Usnic acid biological activity: history, evaluation and usage. Inter J Bas & Clin Pharmacol. 2017; v. 6(12): 2752-2759. <https://doi.org/18.203/2319-2003.ijbcp20175072>

51. Segall MD, Barber C. Addressing toxicity risk when designing and selecting compounds in early drug discovery. Drug Discov. Today. 2014; 19 (5): 688-693. <https://doi.org/10.1016/j.drudis.2014.01.006>

52. Kristmundsdóttir T, Aradóttir HA, Ingólfssdóttir K, Ögmundsdóttir HM. Solubilization of the lichen metabolite (+)-usnic acid for testing in tissue culture. J Pharm Pharmacol. 2002; 54 (11):1447–1452. <https://doi.org/10.1211/002235702225> PMID: 12495546

53. Jin J-q, Rao Y, Bian X-l, Zeng A-g, Yang, G-de. Solubility of (+)-usnic acid in water, ethanol, acetone, ethyl acetate and n-hexane. J Solution Chem. 2013; 42:1018–1027. <https://doi.org/10.1007/s10953.013.0010.1>

54. Göke K, Lorenz T, Repanas A, Schneider F, Steiner D, Baumann K et al. Novel strategies for the formulation and processing of poorly water soluble drugs. Eur J Pharm Biopharm. 2018; 126: 40-56. <https://doi.org/10.1016/j.ejpb.2017.05.008>

55. Araújo HAD, Aires AL, Soares CLR, Brito TGS, Nascimento WM, Martins MCB et al. Usnic acid potassium salt from *Cladonia substellata* (Lichen): Synthesis, cytotoxicity and *in vitro* anthelmintic activity and ultrastructural analysis against adult worms of *Schistosoma mansoni*. Acta Trop. 2019; 192:1-10. <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2018.12.024>

56. Silva EC, Rayol CD, Medeiros PL, Figueiredo RCBQ, Piuvezan MR, Filho JMB et al. Antileishmanial Activity of Warifteine: A Bisbenzylisoquinoline Alkaloid Isolated from *Cissampelos sympodialis* Eichl. (Menispermaceae). Sci World J. 2012; 2012:1-5. <https://doi.org/10.1100/2012/516408>

57. Corral-caridad MJ, Moreno I, Toraño A, Domínguez M, Alunda JM. Effect of Allicin on promastigotes and intracellular amastigotes of *Leishmania donovani* and *L. infantum*. Exp Parasitol. 2012; 132(4): 475-482. <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2012.08.016> PMID: 22995646

58. Drenckhahn D, Schulter K, Allen DP, Benett V 1985. Colocalization of band 3 with ankirin and spectrin at the basal membrane of intercalated cells in the rat kidney. Sci. 1985; 230(4731): 1287-1289. <https://doi.org/10.1026/science.2933809>

59. Kohl L, Gull K. Molecular architecture of the Trypanosome cytoskeleton. Mol Biochem Parasitol. 1998; 93: 1-9. PMID: 9662023

60. Robinson D, Beattie P, Sherwin T, Gull K. Microtubules, tubulin, and microtubule-associated proteins of trypanosomes. Methods Enzymol. 1990; 196:285-299. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(91\)96027](https://doi.org/10.1016/0076-6879(91)96027) PMID: 2034124

61. Ambit A, Woods KL, Cull B, Coombs GH, Mottram JC. Morphological Events during the Cell Cycle of *Leishmania major*. Eukaryot Cell. 2011; 10:1429–38. <https://doi.org/10.1128/EC.05118-11> PMID: 21926331
62. Akpunarlieva S, Burchmore R. The role of membrane transporters in *Leishmania* virulence. Emerg Topics in Life Sci. 2017; 1: 601-611. <https://doi.org/10.1042/ETLS.201701>
63. Bilbao-Ramos P, Galiana-Roselló C, Dea-Ayela MA, González-Alvarez M, vega C, Rólon M et al. Nuclease activity and ultrastructural effects of new sulfonamides with anti-leishmanial and trypanocidal activities. Parasitol Int. 2012; 61(4): 604-613. <https://doi.org/10.1016/j.parint.2012.05.015> PMID: 22668836
64. Shonfeld P, Wieckowski MR, Wojtezak L. Long-chain fatty acid-promoted swelling of mitochondria: further evidence for protonophoric effect of fat acids in the inner mitochondrial membrane. FEBS Lett. 2000; 47(1): 108-112. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(00\)01376-4](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(00)01376-4)
65. Van Rossum GDV, Russo MA, Schisselbauer JC. Role of the cytoplasmic vesicles in volume maintenance. Curr Top Member. 1987; 30: 45-74. [https://doi.org/10.1016/S0070-2161\(08\)60367-6](https://doi.org/10.1016/S0070-2161(08)60367-6)
66. Rodrigues JF, Souza W. Ultrastructural alterations in organelles of parasitic protozoa induced by different classes of metabolic inhibitors. Curr. Pharm. Des. 2008; 14 (9):925-938. <https://doi.org/10.2174/138161208784041033> PMID: 18473841
67. Rodrigues JCF, Godinho JLP, De Souza W. Biology of human pathogenic trypanosomatids: epidemiology, life cycle and ultrastructure. Proteins and Proteomics of *Leishmania* and *Trypanosoma*. Subcell Biochem. 2014; 74: 1-42. https://doi.org/10.1007/978-94-007-7305-9_1 PMID: 24264239
68. Martins TVF, Zeraik AE, Alves NO, Oliveira LL, Mendes TAO, De Marco R, Marques-da-Silva EA. Lipophosphoglycan 3 From *Leishmania infantum chagasi* Binds Heparin With Micromolar Affinity. Bioinform Biol Insights. 2018; 12: 1-12. <https://doi.org/10.1177/1177932218763363>
69. Pinto-Martinez A, Rodríguez-Durán J, Serrano-Martin X, Hernandez-Rodriguez V. Mechanism of action of miltefosine on *Leishmania donovani* involves the impairment of acidocalcisome function and the activation of the sphingosine-dependent plasma membrane Ca^{2+} channel. Antimicrob Agents Chemother. 2017; 62(1): e01614-e01617. <https://doi.org/10.1128/AAC.01614-17>
70. Yao C, Dixit UG, Barker JH, Teesch LM, Love-Homan L, Donelson JE, Wilson ME. Attenuation of *Leishmania infantum chagasi* metacyclic promastigotes by sterol depletion. Infect. Immun. 2013; 81(7), 2507–2517. <https://doi.org/10.1128/IAI.00214-13> PMID: 23630964

4.3 MANUSCRITO A SER ENCAMINHADO PARA A PLOS ONE



Intitulado:

ESTUDO PROTEÔMICO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DO USNATO DE POTÁSSIO FRENTE AS FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania* (L.) *infantum chagasi*

João S. B. da Luz^{1,2*}, Klewdma F. Araújo^{1,2}, Erwelly B. de Oliveira^{1,2}, Mônica C. B. Martins³, Nicácio H. da Silva³, Gustavo B. de Lima⁴, Tercílio Calsa Júnior⁵, Elton P. N. Pena⁵, Claudio G. Rodrigues⁶, Eliete C. Silva^{1,2}, Paloma L. Medeiros^{1,2*}

¹ Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-901 Recife, PE, Brasil

² Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-901 Recife, PE, Brasil

³ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-901 Recife, PE, Brasil

⁴ Laboratório de Microbiologia, Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ), Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-901 Recife, PE, Brasil.

⁵ Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas (LGPP), Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-901 Recife, PE, Brasil

⁶ Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-901 Recife, PE, Brasil

Qualis CAPES:

Periódicos

ISSN	Título	Área de Avaliação	Classificação
1932-6203	PLOS ONE	FARMÁCIA	A2

ESTUDO PROTEÔMICO DOS MECANISMOS DE AÇÃO DO USNATO DE POTÁSSIO FRENTE AS FORMAS PROMASTIGOTAS DE *Leishmania (L.) infantum chagasi*

João S. B. da Luz^{1,2*}, Klewdma F. Araújo^{1,2}, Erwelly B. de Oliveira^{1,2}, Mônica C. B. Martins³, Nicácio H. da Silva³, Gustavo B. de Lima⁴, Tercílio Calsa Júnior⁵, Elton P. N. Pena⁵, Claudio G. Rodrigues⁶, Eliete C. Silva^{1,2}, Paloma L. Medeiros^{1,2*}

¹ Programa de Pós-graduação em Inovação Terapêutica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-901 Recife, PE, Brasil

² Departamento de Histologia e Embriologia, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-901 Recife, PE, Brasil

³ Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-901 Recife, PE, Brasil

⁴ Laboratório de Microbiologia, Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ), Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-901 Recife, PE, Brasil.

⁵ Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas (LGPP), Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-901 Recife, PE, Brasil

⁶ Departamento de Biofísica e Radiobiologia, Universidade Federal de Pernambuco, Av. Prof. Moraes Rego, 1235, 50670-901 Recife, PE, Brasil

Abstract

Background: The present study aimed to identify the proteins differentially accumulated in protein extracts of *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* promastigotes on the effect of usnic acid potassium salt (PS-UA) to elucidate the possible mechanisms of action of this phytopharmaceutical on the parasite.

Methodology/Principal Findings: The extracts proteins were separated by bidimensional electrophoresis (2D) and identified by mass spectrometry. Approximately 450 *spots* were observed in the 2D gels. About 81 protein *spots* were exclusive to the control and 63 *spots* of the protein extract of the *L. (L.) infantum chagasi* promastigotes were submitted to the action of PS-UA and were observed differential accumulation of 29 protein *spots* between treated and untreated groups that were identified through mass spectrometry.

Conclusions/Significance: The present study represents a significant contribution not only in identifying of the parasite molecules, but also in revealing possible mechanism of action of PS-UA against *L. (L.) infantum chagasi* promastigotes forms, contributing to the search for more effective and less toxic drugs.

Keywords: potassium usnate; proteome profiling; *Leishmania (L.) infantum chagasi*.

Author Summary

Leishmaniasis is a group of diseases caused by a protozoan of the genus *Leishmania*, mainly affecting poor people in Africa, Asia and Latin America, and is associated with malnutrition, population displacement, precarious housing, immunodeficiency and lack of financial resources. The pentavalent antimonials used for treatment of this disease are limited with respect to the use, especially due to toxicity and/or ineffectiveness. Soon, the search for new phytochemicals with antiparasitic action emerges as an alternative to existing treatments, due to the low toxicity and cost reduction. Potassium Salt, derived from Usnic Acid (PS-UA) is soluble in water and has a higher efficacy and lower toxicity. In the present study aimed to identify the differentially accumulated proteins (DAPs) in protein extracts of *Leishmania (L.) infantum chagasi* promastigotes forms under effect of PS-UA (6,25 µg/mL) when compared to untreated promastigotes to elucidate the possible mechanisms of action. Protein extracts from all samples were analyzed after extraction with trichloroacetic acid (TCA) and acetone by means of one-dimensional (1D) and two-dimensional (2D) electrophoresis. For 2D gel electrophoresis, the samples were applied to IPG strips (13 cm, pH 3-10) and the images evaluated by *ImageMaster platinum 2D 7.0* software. In the verification of the overlap of the gels, we obtained percentages of matchings higher than 95% between untreated promastigote forms and treated with PS-UA. 173 protein spots were detected, of which 81 protein spots were exclusive of the untreated group (control) and 63 protein spots of the gel corresponding to the protein extract of promastigote forms treated with PS-UA. The results revealed the differential accumulation of 29 protein spots, identified through mass spectrometry (MALDI TOF/TOF) of the promastigote forms treated with PS-UA compared to the control group. The mean difference between groups was determined using unidirectional analysis (ANOVA) and values with $p < 0.05$ were considered statistically significant. All statistical analyzes were performed using *ImageMaster platinum 2D 7.0* software. Among the differentially accumulated proteins, the Translation Initiation Fator (IF-2), important in the protein synthesis was reduced under the effect of PS-UA. In the genetic ontology for regulation of biological processes it was verified that the PS-UA exerted considerable influence with respect to the expression of proteins. We conclude that PS-UA presented a mechanism of action similar to drugs as paramomicin, inhibiting protein synthesis, and further studies are needed to elucidate other mechanisms of action.

Keywords: Potassium usnate. Proteomic study. *Leishmania (L.) infantum chagasi*.

RESUMO

A leishmaniose é um grupo de doenças causadas por um protozoário do gênero *Leishmania*, afetando principalmente pessoas pobres na África, Ásia e América Latina, e está associado à desnutrição, deslocamento populacional, habitação precária, imunodeficiência e falta de recursos financeiros. Os antimonial pentavalentes usados para o tratamento desta doença são limitados em relação ao uso; especialmente devido à toxicidade e/ou ineficácia. Logo, a busca por novos fitofármacos com ação antiparasitária, surge como uma alternativa aos tratamentos existentes, devido à baixa toxicidade e redução de custos. O Sal de Potássio, derivado do Ácido Úsnico (PS-UA) é solúvel em água e tem maior eficácia e menor toxicidade. No presente estudo objetivou-se identificar as proteínas diferencialmente acumuladas (DAPs) em extratos proteicos das formas promastigotas de *Leishmania (L) infantum chagasi* sobre o efeito do PS-UA (6,25 µg /mL) quando comparadas às formas promastigotas não tratadas para elucidar os possíveis mecanismos de ação. Os extratos proteicos de todas as amostras foram analisados após extração com ácido tricloroacético (TCA) e acetona, por meio de eletroforese unidimensional (1D) e bidimensional (2D). Para a eletroforese 2D, as amostras foram aplicadas em fitas IPG (13 cm, pH 3-10; GE-General Healthcare) e as imagens analisadas pelo software *ImageMaster platinum 2D 7.0*. Na verificação da sobreposição dos géis, obtivemos porcentagens de *matchings* superiores a 95% entre extratos proteicos das formas promastigotas não tratadas e tratadas com usnato de potássio. 173 *spots* proteicos foram detectados, dos quais 81 *spots* proteicos foram exclusivos do grupo não tratado (controle) e 63 *spots* proteicos do gel correspondem ao extrato proteico das formas promastigotas tratadas com usnato de potássio. Os resultados revelaram um acúmulo diferencial de 29 *spots* proteicos, identificados através da espectrometria de massas (MALDI TOF/TOF), das formas promastigotas tratadas com usnato de potássio quando comparadas ao grupo controle. A diferença de médias entre grupos foi determinada usando análise unidirecional (ANOVA) e valores com $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significantes. Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software *ImageMaster platinum 2D 7.0*. Dentre as proteínas diferencialmente acumuladas, o Fator de Iniciação Traducional (IF-2), importante na síntese proteica, apresentou-se reduzido sob efeito do PS-UA. Na ontologia gênica para regulação de processos biológicos verificou-se que PS-UA exerceu considerável influência com relação à expressão de proteínas. Concluímos que o PS-UA apresentou um mecanismo de ação semelhante a fármacos como paromomicina, inibindo a síntese proteica, sendo necessários maiores estudos para elucidar outros mecanismos de ação.

Palavras chaves: Usnato de potássio. Estudo proteômico. *Leishmania (L) infantum chagasi*. Eletroforese 2D

1 INTRODUÇÃO

A leishmaniose visceral (LV) é uma doença parasitária importante, com uma distribuição mundial em 88 países, e um total de 350 milhões de pessoas em risco. Afeta principalmente pessoas pobres da África, Ásia e América latina, e está associada com mal nutrição, deslocamento populacional, moradia precária, sistema imune deficiente e por falta de recursos financeiros [1]. No Brasil, a doença é uma zoonose endêmica causada por um protozoário *Leishmania (L.) infantum chagasi* [2].

Por mais de 50 anos, os derivados de metais pesados, principalmente os pentavalentes antimoniais, têm sido usados como fármacos de escolha para o tratamento das leishmanioses; entre eles, os principais são o estibogluconato de sódio (Pentostam®) e metil-glucamina (Glucantime®) [3]. Entretanto, os pentavalentes antimoniais causam muitos efeitos tóxicos, tais como: náusea, vômito, diarreia, erupções cutâneas, tontura, arritmia cardíaca, hipotensão, hepatite e pancreatite. Além disso, a administração destes fármacos é difícil, baixas dosagens favorecem a resistência do parasita e elevadas dosagens são tóxicas, constituindo um problema maior pela inexistência de uma vacina eficaz [4]. A anfotericina B, a pentamidina, o miltefosine e a paromomicina têm sido as drogas alternativas utilizadas nos casos de resistência aos antimoniais, mas não possuem um índice terapêutico tão favorável, além de apresentar importantes reações adversas [5]. Dentre elas, a paromomicina apresenta um mecanismo de ação baseado na alteração da síntese de proteínas, através do bloqueio do sítio de ligação do RNAr, além da interferência na atividade mitocondrial e na capacidade de captação de precursores de moléculas [6,7].

Pesquisas têm demonstrado o uso popular de plantas no tratamento de leishmanioses tanto por via oral, como na aplicação tópica sobre as lesões cutâneas. Muitas plantas apresentam em sua composição estrutural, substâncias descritas na literatura com atividade leishmanicida [8]. O ácido úsnico é um dos metabólitos secundários bioativos mais estudados e encontrado principalmente nos líquens dos gêneros *Cladonia*, *Usnea* e *Cetraria* [9], mas sua aplicação clínica é limitada, por causa da sua baixa solubilidade e alta hepatotoxicidade [10,11,12]. O usnato de potássio é um produto da salinização do ácido úsnico, aumentando sua solubilidade e buscando melhorar sua eficácia.

A proteômica representa um conjunto de técnicas que permite aumentar nosso conhecimento sobre a célula baseando-se na identificação e quantificação de proteínas em diferentes condições sendo a eletroforese bidimensional (2D), uma das ferramentas

para estudar a expressão de proteínas de larga escala [13]. A análise das proteínas utilizando 2D envolve a separação sistemática, identificação e quantificação de muitas proteínas simultaneamente a partir de uma única amostra e é complementada pela espectrometria de massas (ME) para identificação das proteínas [14,15].

A abordagem proteômica diferencial aplicadas ao estudo dos padrões de acúmulo das proteínas, oferecem a possibilidade de atribuir funções potenciais destas proteínas, novos marcadores para o diagnóstico, candidatas a vacinas e/ou potenciais alvos de drogas [16-18].

No presente estudo, propõem-se um estudo proteômico das formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* tratadas com usnato de potássio, comparando com as formas promastigotas não tratadas, visando detectar e identificar as proteínas diferencialmente acumuladas, e assim procurar elucidar os possíveis mecanismos de ação deste fitofármaco sobre o parasita.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Área de Desenvolvimento das Pesquisas

Parte deste estudo foi realizado no Laboratório de Cultura de Tecidos do Departamento de Histologia e Embriologia (LCT-DHE) do Centro de Biociências (CB) da Universidade Federal de Pernambuco (UFPE). Em colaboração foram utilizadas as dependências do Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica-CB/UFPE, Laboratório de Microbiologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ), Laboratório de Genômica e Proteômica de Plantas (LGPP) do Departamento de Genética e a realização da espectrometria de massas em colaboração com o CETENE (Centro de Tecnologia do Nordeste).

2.2 Obtenção do Ácido úsnico e síntese do usnato de potássio

O ácido úsnico, metabólico secundário da espécie *Cladonia substellata* Vainio foi extraído, purificado e modificado estruturalmente para usnato de potássio no Laboratório de Produtos Naturais do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de Pernambuco, e ambos foram obtidos na forma de um pó liofilizado. O ácido úsnico foi obtido de 75 g do talo da *C. substellata* Vainio, que foi triturado e submetido à extração somente com éter dietílico em aparelho de Soxhlet a 40°C por 72 horas; em seguida foi concentrado em rotaevaporador acoplado a banho-maria a 40°C. Para purificação da substância, o extrato etéreo foi fracionado em coluna de sílica gel (porosidade 70-230 mesh) e eluída com sistema

de solvente clorofórmio: n-hexano (80:20 v/v) conforme metodologia descrita na literatura [19].

A modificação da estrutura química do ácido úsnico em usnato de potássio foi obtida com a dissolução parcial do ácido úsnico em água destilada a 40°C e com a adição de hidróxido de potássio a 10%, em pH 11. A amostra foi congelada em *freezer* (- 80°C) e posteriormente liofilizada de acordo com protocolo previamente descrito [20].

A análise da estrutura molecular do PS-UA foi confirmada através das técnicas de Espectroscopia no Infravermelho (IV) e de Ressonância Magnética Nuclear (RMN).

2.3 Cepas de *Leishmania*

Os parasitas foram cedidos pelo Dr. Osvaldo Pompílio de Melo Neto do Departamento de Microbiologia do Instituto Aggeu Magalhães (IAM/FIOCRUZ). Foram utilizadas cepas das formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR2000/Merivaldo2) em fase exponencial de crescimento. Os parasitas foram mantidos em meio Schneider (Sigma, St.Louis, MO, USA), suplementado com 20% de soro bovino fetal (SBF, Sigma), 20 mM L-glutamina, 200 UI/mL de penicilina, e 100 µg/mL de estreptomicina em pH 7,2 e colocados em estufa de BOD a 26°C. Todos os experimentos foram realizados com parasitos na fase logarítmica de crescimento. Foram utilizados dois grupos: um tratado com usnato de potássio na concentração de 6,25 µg/mL (IC₅₀) e um grupo não tratado (controle). Três culturas independentes de cada grupo foram obtidas, centrifugadas, lavadas com PBS, lisadas pelo método de maceração com nitrogênio líquido e armazenadas a -20°C para a preparação do extrato proteico.

2.4 Preparação do extrato proteico

A extração proteica das formas promastigotas de *Leishmania (L.) infantum chagasi* (MHOM/BR/Merivaldo2) do grupo tratado e não tratado para as eletroforeses unidimensional (1D) e bidimensional (2D) seguiu o protocolo de precipitação TCA/Acetona [21] combinado com a solubilização das proteínas pelo método ureia-tioureia [22]. Foi realizado um processo de lise das formas promastigotas dos parasitas dos grupos tratados e não tratados (2×10^7 e $0,8 \times 10^7$ parasitas, respectivamente), através do nitrogênio líquido, adicionando-se neste extrato um inibidor de proteases e logo depois foram centrifugados. Os *pellets* foram ressuspensos em solução ureia-tioureia (7 M:2 M). O extrato proteico foi armazenado em *freezer* (- 80°C) até o uso.

2.5 Quantificação das proteínas

As amostras solúveis foram quantificadas através do protocolo de quantificação [23] que utiliza o *Coomassie brilliant blue* G-250 como reagente de coloração e a albumina de soro bovino (BSA) para estabelecimento da curva padrão. Partiu-se de 10 µL das amostras proteicas e 2 mL do reagente de Bradford para serem analisadas em espectrofotômetro de luz visível (Biospectro SP-220) a 595 nm. As concentrações proteicas foram calculadas através da interpolação dos valores obtidos com uma curva padrão de BSA ($R_2 \geq 0,95$). As amostras foram armazenadas a -80° C até o momento de uso.

2.6 Eletroforese unidimensional

Os extratos proteicos foram acompanhados por eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), segundo protocolo estabelecido [24], em gel com 12,5% de acrilamida com a utilização de tampão 25 mM de Tris base, 192 mM de glicina e 0,1% (p/v) de SDS. Para cada amostra foi utilizada uma massa estimada de 30 µg de proteínas.

2.7 Eletroforese bidimensional

2.7.1 Focalização Isoelétrica

A focalização isoeletrica (IEF) foi realizada com fita Immobiline™ DryStrip pH de 3-10, de 13 cm não linear (*GE Healthcare*) feito em triplicata com uma mistura equimolar proveniente de três culturas independentes para cada um dos grupos estudados (tratados e não tratados). Foram aplicadas 400 µg (250 µl) de proteínas totais das amostras nas fitas de acrilamida desidratada dissolvidas em solução de ureia 7M, tiouréia 2M, CHAPS 2% (m/v), 19,4 mM de DTT, anfolinas 0,5% (v/v) e azul de bromofenol 0,005% (m/v). Após a reidratação das fitas (*overnight*, na temperatura de 4 a 8°C) a focalização isoeletrica foi realizada no dispositivo IPGphor III Isoelectric Focusing Unit (*GE Healthcare*) à temperatura de 20° C, por 5 horas. As fitas foram focalizadas em gradiente de pH imobilizado, em três etapas, nas seguintes condições: 500 V - 500 V/h, 1000 V - 800 V/h, 8000 - 11300 V/h, 8000 -2900 V/h. Durante toda a focalização, foram mantidas condições constantes de corrente (200 mA) e potência (5 W). Após a focalização as fitas foram armazenadas a -20° C até a realização da eletroforese 2D.

2.7.2 Gel de poliacrilamida 2D (SDS-PAGE)

As fitas focalizadas foram colocadas em solução de equilíbrio [Tris-HCl 50mM (pH 6,8), uréia 6M, glicerol 30% (v/v), SDS 2% (m/v) e azul de bromofenol 0,005% (m/v)] em dois processos consecutivos, um de redução e outro de alquilação. As fitas foram submetidas à solução de equilíbrio contendo 1% de Ditionitroto (DTT) por 15 minutos, e posteriormente submetidas à uma nova solução de equilíbrio contendo 2,5% de iodoacetamida (IAA) pelo mesmo período. A eletroforese 2D foi realizada no aparelho Multiphor II Electrophoresis Unit (*GE Healthcare*) em gel de acrilamida de 12,5%. As fitas IPG foram transferidas para o gel de acrilamida e seladas com solução de agarose (agarose e azul de bromofenol em um tampão tris-glicina). A primeira fase da eletroforese ocorreu a 30 mA e 300 V por 15 min, depois a 80 mA e 300 V por 30 min. A segunda fase foram 2 horas a 100 mA e 300 V.

2.7.3 Coloração dos géis

Após a eletroforese, os géis foram mergulhados em solução fixadora (etanol 40%, ácido acético 10%) por 30 min sob agitação constante. Após o descarte da solução fixadora, os géis foram corados com uma solução de azul de *Coomassie brilliant blue* G-250 por 24 horas. O gel foi descorado após quatro lavagens seguidas com água deionizada por 15 min, 45 min e duas vezes por 2 horas. Após as lavagens, os géis foram armazenados em solução de preservação (ácido acético a 5%).

2.7.4 Obtenção e análise de imagens

Os géis 1D e 2D foram digitalizados no equipamento ImageScanner III (*GE Healthcare*) por meio do programa LabScan 6.0 (*GE Healthcare*). As análises dos géis foram realizadas pelo software *ImageMaster 2D platinum* 7.0 para identificar os índices de correlação entre as imagens. Por meio do programa foi realizado a detecção e seleção dos *spots*, manchas coradas e delimitadas presentes nos géis (2D), no qual foram obtidas as informações sobre os *spots*, como sua localização no gel, o ponto isoelétrico (pI), a massa molecular (MW) e porcentagem de volume (% vol). Os géis foram comparados entre si e entre os grupos não tratados e tratados com PS-UA. Foram selecionados os *spots* que apresentavam variação significativa $\text{Ratio} \geq 1,5$ e ANOVA $\leq 0,05$, sendo os mesmos considerados como proteínas diferencialmente acumuladas

(DAPs). Os *spots* que apresentaram mais de 50% de redução ou de maior acúmulo foram manualmente excisados do gel para serem submetidos à digestão por tripsina.

2.7.5 Digestão dos *spots*

Foram realizadas as excisões dos peptídeos detectados (*spots*) nos géis bidimensionais em fragmentos de aproximadamente 1 mm de diâmetro com o auxílio de bisturi e acondicionados em minitubos. Os fragmentos de géis foram descorados em solução de bicarbonato de amônio 50 mM em acetonitrila a 50% por 18 horas. Após essa etapa, os géis foram lavados em 200 µL de água deionizada filtrada e desidratados duas vezes com 200 µL de acetonitrila (100 %) por cinco minutos. Posteriormente, a solução foi removida e os minitubos ficaram abertos dentro do fluxo laminar por 20 minutos a temperatura ambiente para evaporação da acetonitrila. Após a evaporação, foram adicionados 10 -15 µL (até cobrir o fragmento do gel) de solução com 20 ng/µL de tripsina para digestão das proteínas e as amostras foram incubadas em gelo por 30 min. Depois da reidratação, foi adicionada solução de bicarbonato de amônio 50 mM cobrindo todo o fragmento de gel, e a digestão mantida a 37°C por 16 h. Após este período, foram acrescentados 20-30 µL (até cobrir o fragmento de gel) de solução de extração [5 % de ácido trifluoroacético (TFA) em 50 % de acetonitrila], incubada por uma hora a 37° C. Os minitubos foram centrifugados e o sobrenadante transferido para um novo tubo. Este procedimento foi realizado duas vezes, totalizando duas extrações. O sobrenadante de cada *spot* e banda foi concentrado a vácuo (Speed-vac, Eppendorf) e armazenado no freezer -20°C até a realização das análises por espectrometria de massas.

2.7.6 Espectrometria de massas (MS)

Os espectros que contém a informação relativa à massa molecular dos peptídeos oriundos da digestão enzimática (*Peptide Mass Fingerprint* – PMF) foram obtidos em espectrômetro AutoFlex III MALDI-TOF/TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), baseado na ionização por dessorção a laser assistida por matriz (MALDI/TOF). Os peptídeos digeridos foram eluídos em 10 µL de solução de 0,3 % ácido trifluoroacético (TFA). Posteriormente, os peptídeos foram aliquotados e eluídos em solução de matriz (1 % ácido α -ciano-4- hidrocinâmico) na proporção 1:1. As análises foram realizadas de acordo com os parâmetros do método reflexivo (RP_Proteomics), excluindo-se da análise íons com razão massa carga (m/z) menor que 700 Da.

2.7.7 Identificação das proteínas

Os *spots* proteicos de interesse foram extraídos do gel e submetidos à digestão conforme a literatura [24]. Os peptídeos digeridos foram analisados por espectrometria de massas (MALDI TOF/TOF). Os espectros gerados foram analisados no programa FlexAnalysis (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha) para determinação das massas resultantes. A identificação das proteínas foi realizada por meio de busca no banco de dados do software MASCOT.

2.7.8 Análise das informações

Os espectros gerados pelo sequenciamento dos peptídeos de cada amostra foram processados e analisados pelo programa MASCOT. Para a busca na base de dados do programa foram selecionados alguns parâmetros que estão especificados na tabela 1.

Tabela 1: Parâmetros para busca de dados a partir dos espectros do MALDI TOF	
Banco de dados	Leishmania, Trypanosoma e Swissprot
Taxonomia	<i>Leishmania infantum</i> ; <i>Leishmania brasiliensis</i> ; <i>Trypanosoma cruzi</i> ; <i>Trypanosoma Brucei</i> e outros alveolatas
Enzima	Tripsina
Número de clivagens perdidas	1
Modificações fixas	Carbamidomethyl (C)
Modificações variáveis	Oxidação (M)
Tolerância dos fragmentos	0,1 a 1,2 Da
Instrumento	Bunker Diagnostics

A identificação dos espectros e a correlação de possíveis similaridades com proteínas presentes em bancos de dados foram realizadas automaticamente pelo programa MASCOT.

Quando a proteína foi identificada, ele recebeu um *score* que foi obtido pelo valor negativo do logaritmo da probabilidade de valor *m/z* teórico de coincidir com o valor *m/z* experimental, portanto, quanto maior o *score*, menor é a probabilidade daquela identificação ser um evento aleatório. Os pesos moleculares e pontos isoeletricos teóricos foram sugeridos pelo banco de dados Leishmania, Trypanosoma e Swissprot referentes à proteína com maior homologia com cada dado experimental.

2.7.9 Análise estatística dos dados

A análise comparativa foi feita no *Match Mode*, a partir da sobreposição das imagens dos géis, os quais foram comparados utilizando a análise de VARIÂNCIA por ONE-WAY seguido pelo pos-teste de Tukey ou *T-Student*. Foi considerado estatisticamente significativo $p < 0,05$. A análise estatística foi realizada usando o programa *ImageMaster 2D platinum 7.0*.

2.7.10 Identificação de processos biológicos associados com proteínas diferencialmente acumuladas

As sequências em formato FASTA das proteínas anotadas foram recuperadas do UniProt através da ferramenta Retrieve ID e submetidas à análise de distribuição de ontologia gênica (GO) por processo biológico.

Para análise funcional, as proteínas identificadas (DAPs) foram agrupadas em categorias funcionais de acordo com as anotações dos processos biológicos obtidos dos bancos de dados do Gene e PANTHER Ontology.

3 RESULTADOS

3.1 Eletroforese 1D

Foram avaliadas as extrações proteicas através da eletroforese 1D das culturas independentes e analisando comparativamente em relação ao grupo não tratado (controle) com grupo tratado (PS-UA), com o objetivo de verificar a qualidade e reprodutibilidade entre as amostras para realização da eletroforese bidimensional 2D e espectrometria de massas (Figura 1).

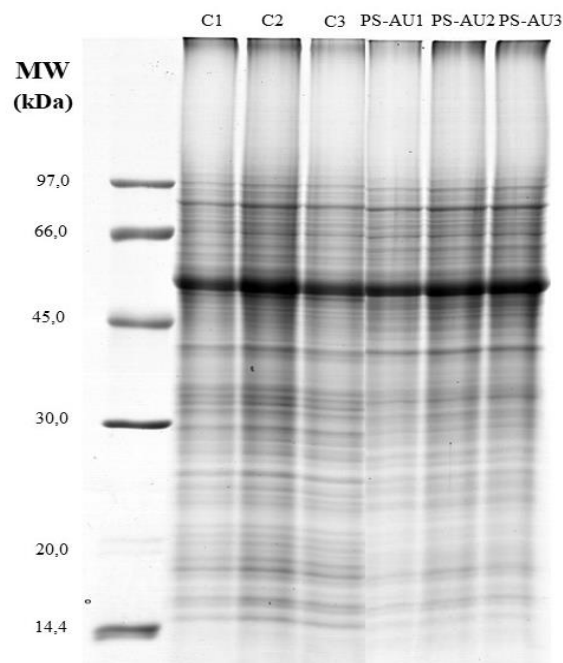


Figura 1: Gel de eletroforese 1D de 12,5% de acrilamida corado com *Coomassie brilliant blue* G250 com 30 µg de proteínas em cada amostra. C (1-3): Extrato proteico das formas promastigotas de *Leishmania (L) infantum chagasi* não tratadas (controle); PS-UA (1-3): Extrato proteico das formas promastigotas de *Leishmania (L) infantum chagasi* tratadas com usnato de potássio.

3.2 Perfil eletroforético em gel bidimensional (2D) em gradiente de pH imobilizado

As proteínas totais das formas promastigotas de *Leishmania (L) infantum chagasi* na fase exponencial de crescimento foram aplicadas em fitas IPG de 13 cm com gradiente de pH 3-10 Não Linear (NL). Os resultados mostraram que a maioria dos *spots* proteicos se concentrou na faixa de pH de 4-7. (Figura 2). Os resultados mostraram que os perfis de proteínas obtidos em géis 2D foram altamente reproduzíveis (*match* >95 %). Neste estudo, foram obtidas imagens dos géis 2D de cada linhagem do grupo não tratado e tratado com PS-UA em triplicata de culturas biológicas independentes e em gradiente de pH 3-10.

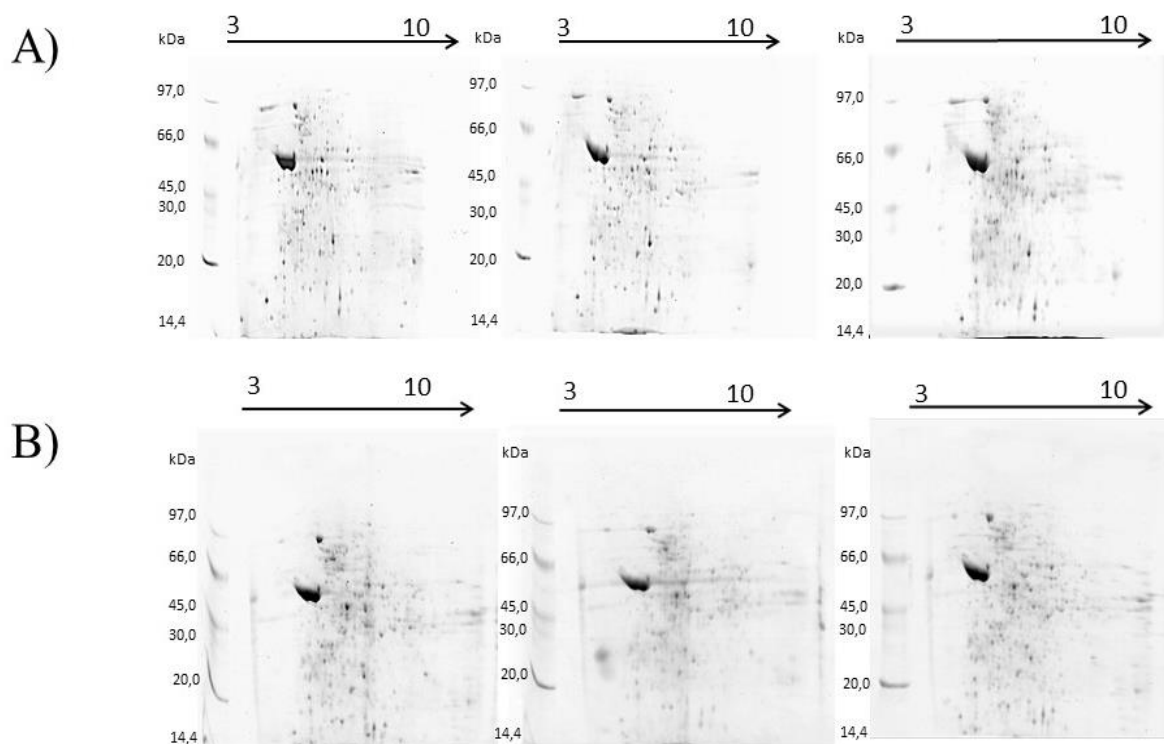


Figura 2: Imagens representativas dos géis 2D de poliacrilamida a 12,5 % corados com *Coomassie Brilliant Blue* G250, utilizando fitas IPGs 13cm, pH 3-10 NL. A) Extratos proteicos das formas promastigotas de *Leishmania (L) infantum chagasi* com 400 µg de proteína não tratadas (controle); B) Extratos proteicos das formas promastigotas de *Leishmania (L) infantum chagasi* com 400 µg de proteína tratadas com PS-UA.

3.3 Análise da reprodutibilidade dos Géis 2D e seleção dos *spots*

Na eletroforese 2D, os *spots*, que são as ‘manchas’ reveladas nos géis, representam uma proteína individual e o conjunto destes *spots* é conhecido como mapa proteico. Neste estudo, foram avaliadas as diferenças entre os géis de cada grupo mediante a análise de correspondência dos *spots*, de acordo com parâmetros de detecção automática previamente estabelecidos.

Para cada grupo (controle e tratado com PS-UA) foram confeccionados três géis 2D a partir fitas de 13 cm, pH 3-10, contendo 400 µg de proteínas de extratos proteicos. A partir desses géis, foi avaliada a reprodutibilidade entre as amostras, através do programa *ImageMaster 2D platinum 7.0* (GE Healthcare). A análise comparativa das imagens mostrou alta reprodutibilidade nos dois grupos estudados, principalmente em relação ao número, intensidade e distribuição dos *spots* nos géis. Os géis 2D dos extratos do grupo controle apresentaram uma média de 452 *spots* e índice de correlação de 0,976. No grupo tratado com usnato de potássio a média de *spots* visualizados foi de 412 e o índice de correlação entre os

géis foi de 0,914. Nesta análise, os índices de correlação com valores próximos a 1 significam 100% de correlação entre as posições relativas dos *spots* nos géis, e esse índice é aceitável quando $> 0,8$ [25].

A partir dos dados gerados, foi feita uma análise quantitativa, considerando a razão da média das densidades dos *spots* proteicos entre os três géis de cada grupo e analisando comparativamente entre os grupos não tratados e tratados com PS-UA. Foram considerados *spots* com diferença quantitativa significativa com valores iguais ou maiores que 1,5 e menores e iguais a -1,5, permitindo assim, localizar os *spots* diferencialmente acumulados e os exclusivos de cada grupo (81 *spots* do grupo não tratado e 63 *spots* do grupo tratado com usnato de potássio) (Figura 3). Cerca de 29 *spots* (DAPs) foram excisados, digeridos por tripsina e realizado espectrometria de massas para identificação proteica para analisarmos comparativamente entre os grupos (Figura 4A-4B).

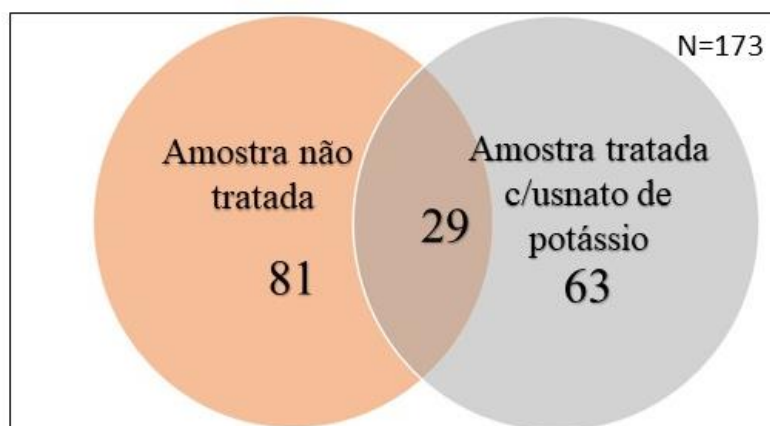


Figura 3: Diagrama de Venn com o número dos *spots* encontrados nos géis de acrilamida dos grupos tratados e não tratados com PS-UA.

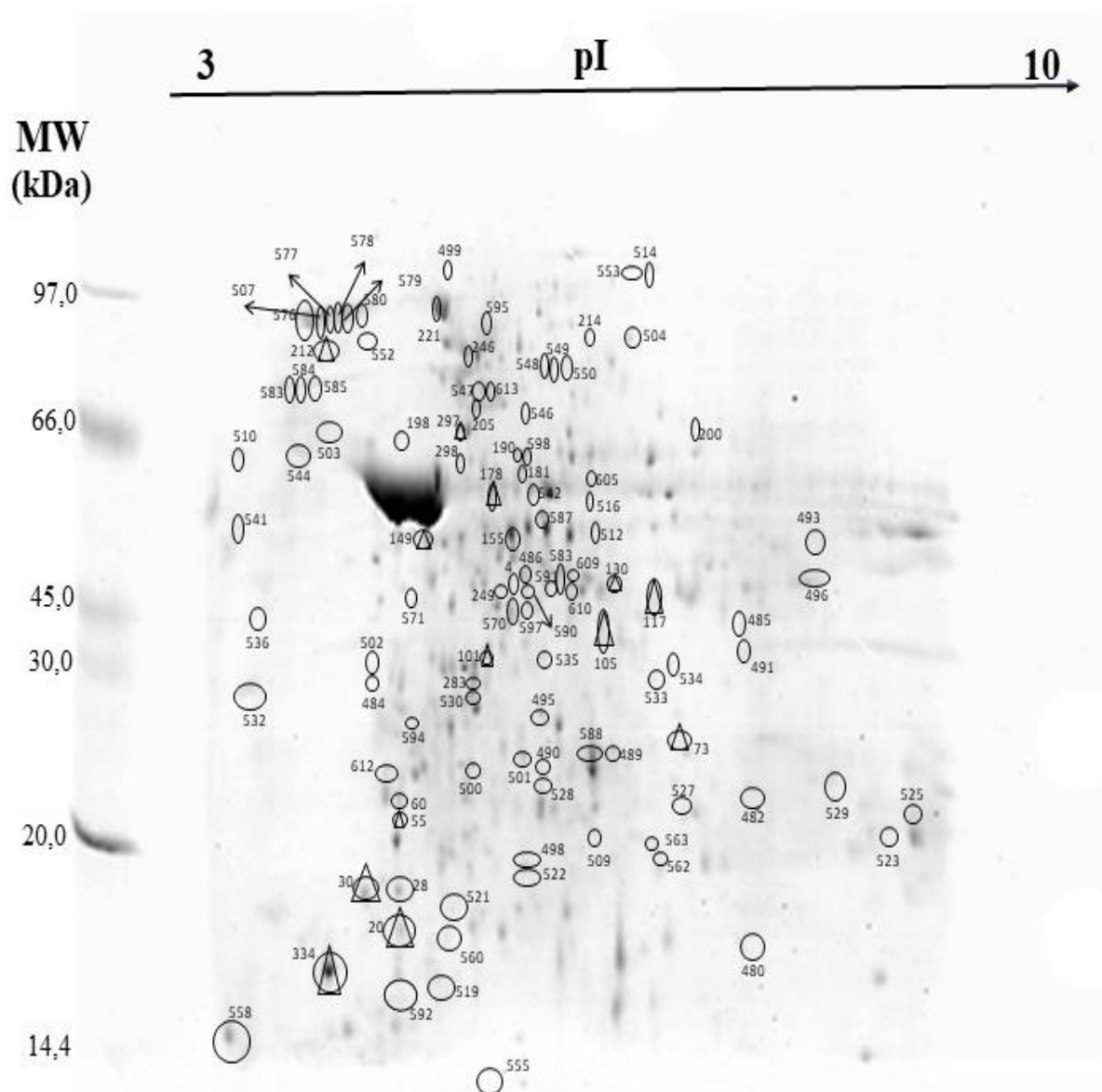


Figura 4A: Imagem representativa do gel 2D (SDS-PAGE 12,5%) de *Leishmania (L) infantum chagasi* corado por *Coomassie Brilliant blue* G250, obtido a partir de fitas de 13 cm, pH 3-10, hidratadas com 400 µg do extrato proteico do grupo não tratado (controle) com os spots marcados. Os spots que apresentam triângulos são os spots comuns e diferencialmente acumulados (DAPs) que foram excisados do grupo não tratado (Controle).

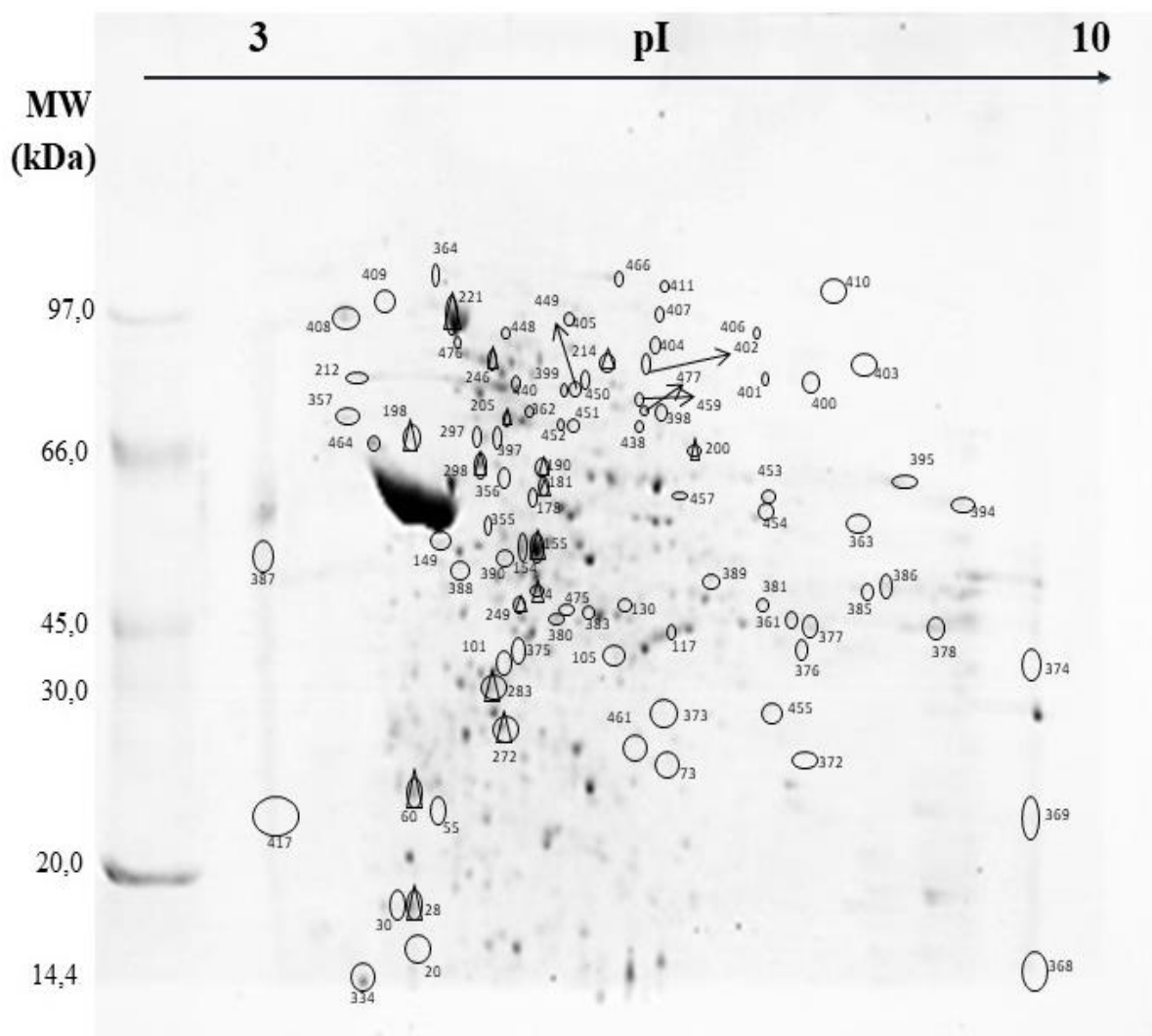


Figura 4B: Imagem representativa do gel 2D (SDS-PAGE 12,5%) de *Leishmania (L) infantum chagasi* tratadas com PS-UA obtido a partir de fitas de 13 cm, pH 3-10, hidratadas com 400 µg do extrato proteico do grupo tratado com usnato de potássio. Os spots que apresentam triângulos são os spots comuns e diferencialmente acumulados (DAPs) que foram excisados do grupo tratado com PS-UA.

No gráfico 1, identificamos os peptídeos diferencialmente acumulados (DAPs) por percentagem de volume entre o grupo não tratado e tratado com PS-UA. Podemos observar que cerca de 16 *spots* (Nº 4, 28, 60, 155, 181, 190, 198, 200, 205, 214, 221, 246, 249, 272, 283, 298) apresentam um acúmulo maior de peptídeos no grupo tratado com PS-UA, se destacando os *spots* (Nº 60, 155 e 221) por apresentarem uma percentagem de volume maior e mais do que o dobro do volume do peptídeo do grupo não tratado. No grupo não tratado obtivemos 13 *spots* (Nº 20, 30, 55, 73, 101, 105, 117, 130, 149, 178, 212, 297 e 334) que apresentaram uma percentagem de volume maior comparado ao grupo tratado.

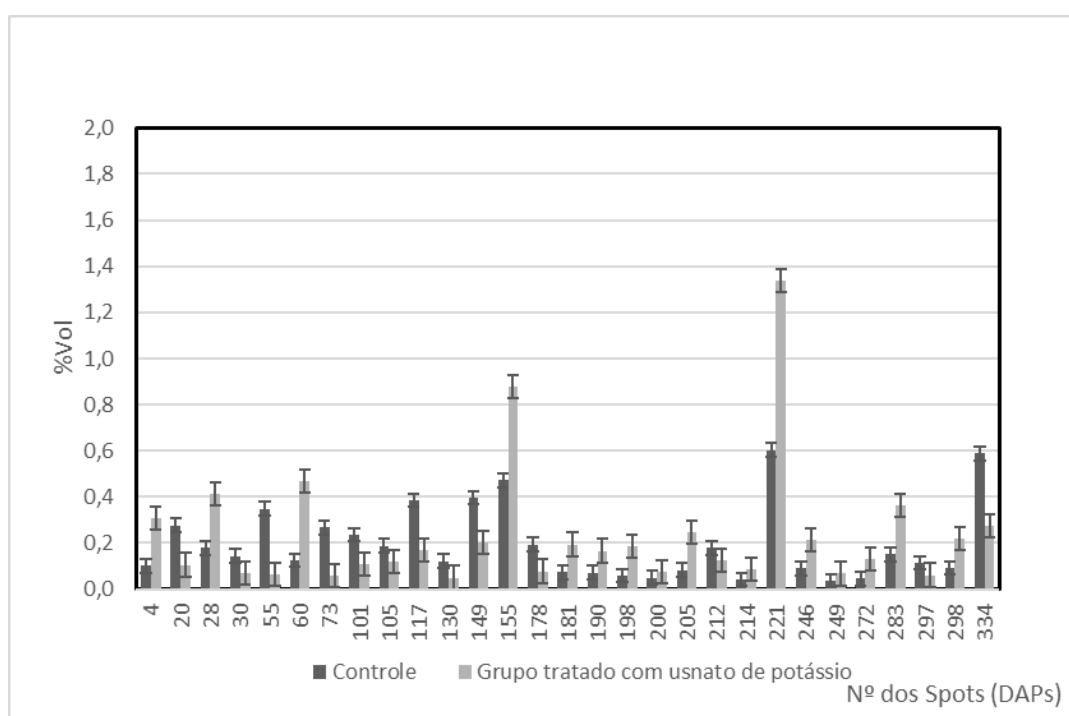


Gráfico 1: Variação dos níveis dos Peptídeos Diferencialmente Acumulados (DAPs), representados por percentagem de volume (%Vol).

3.4. Análise do nível de expressão das proteínas identificadas e diferencialmente acumuladas nos extratos proteicos das formas promastigotas de *Leishmania (L) infantum chagasi*

Dos 29 *spots* proteicos diferencialmente acumulados, apenas 20 proteínas foram identificadas, das quais, 06 proteínas foram não identificadas (Uncharacterized protein), 02 proteínas foram identificadas como hipoteticamente conservadas (Hypothetical protein conserved) e dois *spots* proteicos com a proteína de reparo de DNA RAD50 (RAD50 DNA repair-like protein). As proteínas identificadas seguem abaixo na tabela 2.

Tabela 2- Identificação dos “spots” proteicos, com diferença quantitativa de expressão ($p < 0.05$) entre os extratos proteico do grupo não tratado das formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi* com o grupo tratado com usnato de potássio.

IDs Spots	Ratio	Acess Uniprot	Proteína	Score	Cobertura(%)	pI		Massa	
						Obs.	Cal.	Obs.	Cal.
4	2,30193	Q4D5J1	Uncharacterized protein (Fragment)	56	32%	5,820135	11.01	48029,17	9711
20	2,92837	-	Not identified	-	-	-	-	-	-
28	1,58155	-	Not identified	-	-	-	-	-	-
30	2,1056	A4I7G7	Hypothetical protein conserved	64	25%	4,56802	7.64	19058	37957
55	3,30325	A4HN92	Uncharacterized protein	55	19%	4,87882	10.14	24026,17	63354
60	2,27107	A4H9Y3	Kinesin-like protein	58	24%	4,831894	6.31	24855,2	93906
73	3,55788	Q57VX7	75 kDa invariant surface glycoprotein	81	35%	7,16789	5.50	28009,25	58646
101	1,68041	A4I3C7	RAD50 DNA repair-like protein	62	19%	5,552622	5.81	37725,6	154867
105	1,86264	Q383H9	Methylthioribose-1-phosphate isomerase	62	18%	6,50928	6.22	41532,25	33755
117	1,85274	A4I3Z4	IQ_calmodulin-binding_motif_containing_protein_	58	15%	6,954004	10.09	44454,4	194942
130	2,46717	A4IC57	Polyadenylate-binding protein	74	26%	6,609033	9.00	47525	62966
149	1,62435	A4HZB9	Hypothetical_protein_- _conserved	62	18%	5,016528	8.18	52669,5	147197
155	1,72999	Q384J8	RAD50 DNA repair-like protein	55	22%	5,832193	5.85	52697	153903
178	1,57115	A4HQB1	Uncharacterized protein	63	48%	5,720564	5.95	58976,8	33801
181	2,21046	Q387Z1	Uncharacterized protein	53	23%	5,880252	9.24	60700,67	25824
190	1,81289	-	Not identified	-	-	-	-	-	-
198	2,30939	A4H460	Putative nucleolar RNA helicase II	55	10%	4,78042	8.29	66683,67	75509
200	1,8677	-	Not identified	-	-	-	-	-	-
205	1,93099	A4HQB1	Uncharacterized protein	54	14%	4,78042	5.95	70995,17	33800
212	1,51286	A4IC57	Polyadenylate-binding protein	56	24%	4,129068	9.00	82500,75	62966
214	1,78323	-	Not identified	-	-	-	-	-	-
221	1,92958	Q4DAM3	Uncharacterized protein	60	17%	5,11297	8.89	92177,5	23351
246	1,61011	-	Not identified	-	-	-	-	-	-
249	1,86815	-	Not identified	-	-	-	-	-	-
272	2,10984	-	Not identified	-	-	-	-	-	-
283	1,8825	EF1A_EIMBO	Elongation factor 1-alpha (Fragment)	44	25%	5,530125	9.12	34669,75	37709
297	1,52853	A4HBD9	Contig, possible fusion of chromosomes 20 and 34	80	11%	5,279182	6.10	68100,6	481388
298	1,9525	-	Not identified	-	-	-	-	-	-
334	1,73875	Q57TS5	Translation initiation factor IF-2	74	19%	4,325172	8.76	16780,17	97924

Kinesinas (Kinesin – like protein)

A análise proteômica revelou que houve um aumento do nível de expressão desta proteína mais de duas vezes, quando as formas promastigotas de *L. (L) infantum chagasi* foram submetidas à ação do PS-UA. Elas pertencem à superfamília de proteínas motoras associadas aos microtúbulos, que são responsáveis pelo transporte de moléculas/organelas ao longo dos microtúbulos, interagem seletivamente e não covalentemente, na divisão celular, na formação do citoesqueleto e movimento flagelar. Para estes processos, utilizam da energia da hidrólise do ATP para gerar energia [26]. Essas proteínas são altamente preservadas na sua sequência de aminoácidos, demonstrando 80 a 90% de identificação com as Leishmanias e 35 a 45% com outros organismos como do gênero *Trypanossoma*, camundongos e humanos [27,28,29].

Glicoproteína de superfície 75 kDa invariante (75 kDa invariant surface glycoprotein)

Na superfície da família Tripanossomatidae, encontramos aproximadamente cerca de 10^7 glicoproteínas variantes de superfície (GVS) que são altamente imunogênicas. As densas camadas de dímeros das GVS agem como moléculas de proteção sobre a glicoproteínas de superfície, dentre elas, o 75kDa invariante [30]. Os nossos resultados demonstraram que houve uma diminuição da expressão desta proteína no extrato proteico das formas promastigotas de *L. (L) infantum chagasi* tratadas com PS-UA.

Proteína de Reparo de DNA RAD50 (RAD50 DNA repair- like protein)

A integridade do genoma é crucial para o desenvolvimento celular adequado para as células eucarióticas. Durante o ciclo vital, é essencial reparar os danos ao DNA para garantir a correta transferência de DNA para as células filhas e prevenir rearranjos cromossômicos inadequados. Nos tripanossomatídeos, o reparo de DNA protege o genoma das mutações, mas também age como um mecanismo que promove a resistência aos fármacos [31]. Os resultados demonstraram que houve um aumento na expressão desta proteína no grupo sob ação do PS-UA.

Metilribose 1-fosfato isomerase (Methylthioribose1-phosphate isomerase)

Catalisa a conversão de metiltioribose-1-fostato (MTR-1P) em metiltioribulose-1-fosfato (MTRu-1-P), participando com atividade catalítica na biossíntese do aminoácido

metionina. Houve uma redução na expressão desta proteína, prejudicando assim, a tradução proteica por diminuição do aminoácido metionina.

Calmodulina (IQ calmodulin binding motif containing protein)

A miosina XXI é a única isoforma de miosina expressa em parasitas do gênero *Leishmania*. Embora ela execute uma variedade de funções motoras, a oligomerização para a motilidade ainda são desconhecidos. A ligação da IQ calmodulina faz com que a miosina adote um estado monomérico e mova os filamentos de actina. Na ausência de calmodulina, dímeros não-movéis são formados, ou seja, ela previne a dimerização [32]. Os resultados mostram que houve uma redução da síntese desta proteína através da análise do gel bidimensional.

Proteína ligante ao Poliadenilato (Polyadenylate- binding protein)

Um dos mecanismos regulatórios utilizados pós transcricionais usados pela *Leishmanias* para controle de expressão de genes, envolve o processamento do pré-mRNAs policistrônico em RNAm maduro. Esses policístrons formam RNAm monocistrônicos maduros através do mecanismo de processamento em “*trans-splicing*” que difere do processamento em “*cis*”, típico da maioria dos eucariotos. O processamento em “*trans*” do pré-RNA policistrônico acrescenta, na extremidade 5' uma sequência denominada *sliced leader* de 39 nucleotídeos, que é característica apenas de RNAm dos tripanossomatídeos, além de encontrar uma estrutura *cap* modificada, denominada *cap 4* e a poliadenilação da extremidade 3' e proteína ligante ao poliadenilato. É a extremidade 3' que regula transcrição e o processamento de conversão em um RNAm monocistrônico [32].

RNA nucleolar helicase II (Putative nucleolar RNA helicase II)

As helicases são enzimas que catalisam a separação do RNA de fita dupla, dependentes de energia nas células eucarióticas e procarióticas, como também nos vírus. A maturação do RNAm na família Trypanosomatidae diferem dos processos na maioria dos eucariotos, porque os genes que codificam as proteínas são descritos como policistrônicos no organismo. Os resultados mostram um aumento na expressão desta proteína, quando as formas promastigotas estão sob ação do PS-UA. [34]

Fator de Elongação 1-alfa (Elongation fator 1-alfa)

O Fator de Elongação 1-alfa (eIF1) é uma enzima que catalisa a ligação do RNAt-aminoacil ao sítio A dos ribossomos durante a síntese proteica e está envolvido na captura do RNAt deacetilado [34,35]. Além disso, o EF1alfa serve como um ponto central nas redes de proteínas com centenas de parceiros de interação [35,36]. No grupo tratado com PS-UA, houve um aumento da expressão proteica desta proteína.

Fusão dos cromossomos 20 e 34 (Contig, possible fusion of chromosomes 20 e 34)

Todas as espécies de *Leishmania* subgênero (*Viannia*) foram caracterizadas geneticamente pela presença de uma pequena troca de uma sequência nucleotídica entre os cromossomos 26 e 35 e mais importante, a fusão dos cromossomos 20 e 34 que estão separados em todas as espécies do velho mundo.

Fator de iniciação traducional IF-2 (Translation initiation fator IF-2)

É um fator de iniciação da tradução proteica do RNAm em um polipeptídeo. Em eucariotos, A tradução se inicia com a acoplagem do complexo ternário, composto pelo complexo IF-2, o Metionina-tRNA_i e o trifosfato de guanosina (GTP), à subunidade menor ribossomal 40S, formando o complexo 43S de pré-iniciação. Essa etapa de montagem é promovida pelos fatores eIF1, eIF1A, eIF3 e eIF5 [37].

3.5 Identificação de processos biológicos associados com proteínas diferencialmente acumuladas

A distribuição de termos do Panther Orthology, ou categorias funcionais, do conjunto de DAPs de cada tratamento foi utilizada na comparação entre proteínas expressas no grupo não tratado (controle) e as proteínas do extrato proteico do grupo tratado com PS-UA (Gráfico 2).

Destacamos quatro categorias funcionais como: reprodução, envolvimento nos processos celulares, metabólicos e de regulação biológica. Podemos observar que as proteínas diferencialmente acumuladas no extrato proteico do grupo tratado por PS-UA apresentam-se em maior volume em relação ao controle, quando estão envolvidas na regulação biológica, cerca de 25 % das proteínas identificadas

e cerca de metade (50%) envolvidas nos processos celulares.

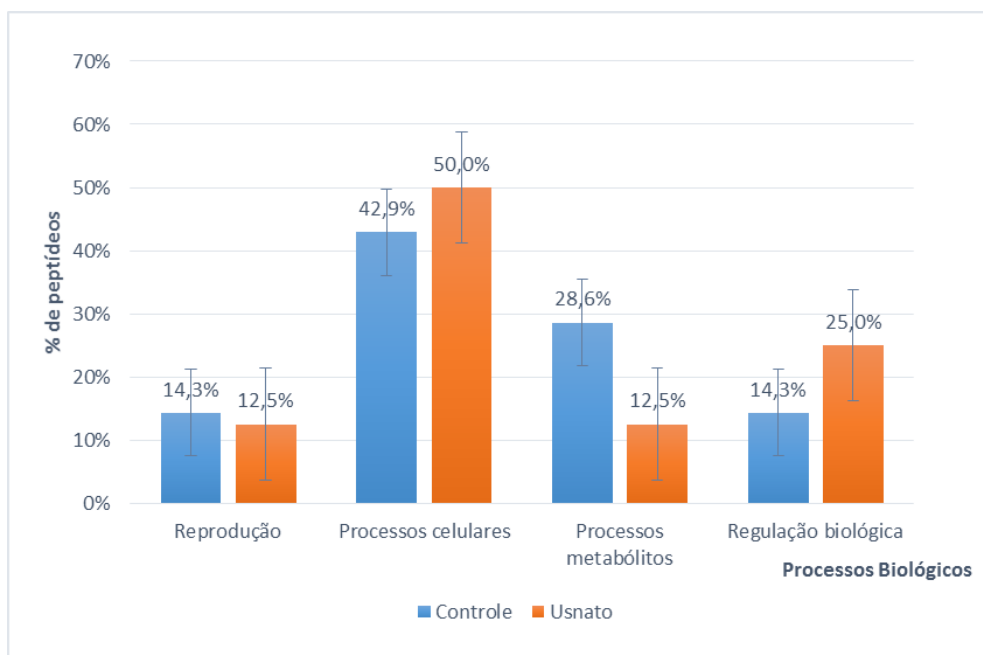


Gráfico 2: Ontologia Gênica para processos biológicos das proteínas diferencialmente expressas (DAPs) nas formas promastigotas de *Leishmania (L) infantum chagasi* não tratadas com PS-UA (Controle) e formas promastigotas de *Leishmania (L) infantum chagasi* tratadas com PS-UA. Valores expressos em percentual.

4 DISCUSSÃO

Devido as dificuldades relacionadas ao tratamento e à falta de uma vacina efetiva, o controle das leishmanioses baseia-se principalmente na quimioterapia. Entretanto o tratamento da leishmaniose visceral conta com poucas opções terapêuticas, que incluem: os antimoniais pentavalentes, anfotericina B, miltefosina e paromomicina que apresentam vários efeitos adversos e até mesmo resistência [5].

Neste trabalho, foi realizada uma análise proteômica comparativa entre as formas promastigotas de *Leishmania (L) infantum chagasi* não tratadas e submetidas ao tratamento com PS-UA, mostrando uma diferença significativa dos perfis proteômicos entre os dois grupos, demonstrando a ação deste fitofármaco sobre a expressão proteica do parasita e influenciando a sua expressão gênica, causando alterações citoplasmáticas e morfológicas, confirmados através da microscopia de varredura e transmissão.

As análises dos géis 2D, revelaram cerca de 173 spots (entre exclusivos e diferencialmente acumulados), dentre eles 29 spots proteicos diferencialmente acumulados

(DAPs) foram estudados, de proteínas que foram expressas pelo parasita na fase exponencial de crescimento e sofreram influência na produção pela ação do PS-UA. Foram identificados 20 *spots* proteicos, que com diferentes funções, interação, e participando ou não do mesmo processo biológico, o fato que justifica o pequeno número de categorias funcionais identificadas. De fato, na literatura têm sido demonstrados que o número de interações e a diversidade de processos biológicos são inversamente proporcionais, ou seja, à medida que a diversidade de processos aumenta, o número de interações diminui [38].

Na tentativa de compreender os mecanismos de ação envolvidos na atividade leishmanicida do PS-UA, este estudo comparou o perfil de expressão proteica das formas promastigotas de *Leishmania (L) infantum chagasi* com o grupo não tratado, sendo necessário a identificação dos *spots* exclusivos para cada grupo para aprofundarmos ainda mais sobre a influência deste fitofármaco sobre as proteínas que deixaram de ser expressas no grupo controle e aquelas que foram expressadas após o stress causado pelo PS-UA.

A resposta ao *stress* consiste, dentre outros, nos mecanismos usados pelo parasito para evadir da resposta imune do inseto e do hospedeiro, e na maquinaria proteica para adaptação do parasito a diferentes temperaturas, pH e stress nutricionais [36].

Dos 29 *spots* diferencialmente acumulados, foram identificadas 20 proteínas, o que corresponde a 68,96% de sucesso na identificação.

Quatro proteínas foram expressas mais do que o dobro no grupo tratado com PS-UA quando comparado ao grupo controle, as identificadas foram elas: As kinesinas, a proteína de reparo de DNA RAD50 e Fator de alongação 1-alfa.

Os microtúbulos são compostos de subunidades de alfa e beta-tubulinas que formam um heterodímero ou uma subunidade microtubular. As kinesinas e dineínas são proteínas motoras associadas aos microtúbulos. A função dos microtúbulos é transporte de vesículas e organelas, estrutura celular e suporte [37,38,39]. Na literatura, o uso de colchicina na inibe a síntese dos microtúbulos no desenvolvimento da *Leishmania amazonensis* dentro do macrófago da linhagem RAW 264.7 [40].

A ausência de estruturas do citoesqueleto pode resultar em aumento da deformidade, elasticidade celular em diferentes estágios do ciclo de vida [41]. A proteínas associadas aos microtúbulos, incluindo actina, filamentos intermediários e proteínas associadas à actina, são componentes do citoesqueleto que são essenciais para a

funcionalidade da célula [42,43,44,45]. Uma hipótese, é que esse aumento da expressão da kinesina acredita-se que seja uma forma de manter a estrutura do citoesqueleto da *Leishmania*, mesmo porque não foram identificadas proteínas como a alfa-tubulina e beta-tubulina.

O extrato proteico das formas promastigotas de *L.(L) infantum chagasi* tratadas com PS-UA apresentaram, aproximadamente, apresentaram DAPs relacionados com a biossíntese proteica, sendo elas: RNA nucleolar helicase II, fator de elongação 1-alfa e fator de iniciação traducional IF-2, metilribose 1-fosfato isomerase, a proteína de ligação ao poliadenilato. A transformação da informação genética do DNA em proteínas funcionais é um processo complexo que envolve inúmeras moléculas e complexos proteicos participando dos processos de transcrição e tradução. O Fator de iniciação traducional (eIF2) desempenha um papel central na manutenção do que é geralmente considerado como um passo limitante na tradução do mRNA. O eIF2 se liga ao GTP e ao Met-iRNA e o transfere à subunidade 40S do ribossomo [45,46]. A fosforilação da menor subunidade de IF2 (alfa) impede a formação do complexo eIF2-GTP-Met-iRNA e a síntese de proteínas. A fosforilação de IF2-alfa ocorre sob uma variedade de condições, incluindo infecção viral, apoptose, privação de nutrientes, privação de ferro heme, e situações de stress [46]. O fator de elongação 1- alfa (EF1-alfa) não é somente o principal fator traducional, mas também uma das mais importantes proteínas multifuncionais, consistindo de 4 subunidades (alfa, beta, gama e delta). A subunidade alfa ligada ao GTP catalisa a reação da ligação do aminoacil-tRNA ao sítio A do ribossomo. Já a EF1-beta catalisa a troca de GDP em GTP na subunidade alfa. Os fatores de elongação têm sido ligados a vários processos celulares importantes, incluindo o controle traducional, transdução de sinal, organização do citoesqueleto, apoptose, e processos nucleares como a síntese de RNA e mitose [47]. Além disso, o EF1-alfa foi encontrado nos exossomos da leishmania e identificados como um importante fator para a imunossupressão das células hospedeiras para a invasão da *Leishmania* [48,49,50].

A metilribose 1-fosfato isomerase é uma enzima que participa na biossíntese do aminoácido metionina que é o aminoácido "iniciador" da maioria das cadeias polipeptídicas, havendo uma diminuição da expressão desta proteína, haverá uma redução significativa na síntese proteica.

A proteína ligante ao poliadenilato regula a transcrição e o processamento de conversão em um RNAm monocistrônico nos Tripanossomatídeos [33].

Se observa um aumento da expressão da RNA helicase II quando as formas promastigotas estão submetidas ao stress causado pelo PS-US, mais uma hipótese sobre o

mecanismo de sobrevivência do parasita. Desta maneira, a inibição da síntese proteica é um dos principais mecanismos de ação do PS-UA, dado pelo número de proteínas identificadas e a relação com esse processo seja na regulação ou na síntese, este mecanismo corrobora com fármacos utilizados na terapêutica como o paromomicina que se liga ao sítio A do RNAr, estabilizando uma conformação em que os nucleotídeos se localizam para fora da região central da hélice do RNAr [51].

A proteína de reparo do DNA RAD50 é o principal mecanismo de defesa é essencial para manutenção da integridade do DNA. Nos tripanossomatídeos, o reparo do DNA protege o genoma contra mutações, mas também age com um mecanismo adaptativo para promover a resistência aos fármacos [31].

A calmodulina se liga aos filamentos de miosina XXI do gênero *Leishmania*. Na ausência ou redução de calmodulina, dímeros não-movéis são formados, ou seja, ela previne a dimerização [32]. Duas frações distintas de miosina foram identificadas: uma na membrana localizada na base do flagelo e outra fração citosólica, provavelmente envolvida no transporte de proteínas.

A glicoproteína não variante, sofreu uma redução na expressão em relação ao grupo controle. Essa glicoproteína é objeto de estudo para determinação de testes sorológicos e de vacinas. Estudos realizados com *Trypanosoma brucei* para pesquisa de vacinas, utilizaram proteínas recombinantes das glicoproteínas não variantes e não tiveram êxito [52].

Com o aumento da expressão da proteína de reparo de DNA, imprescindível como mecanismo de manutenção e resistência, demonstra que o parasita sob *stress*, busca a manutenção do seu ciclo vital; e que a ação do PS-UA com os dados obtidos a partir da DAPs, levantam a hipótese que a inibição da síntese proteica é um dos seus mecanismos para a morte do parasita.

5 CONCLUSÃO

Com os dados obtidos, podemos concluir que:

- O Sal de ácido úsnico (PS-UA) apresentou um mecanismo de ação semelhante a paromomicina, inibindo a síntese proteica e agindo em proteínas responsáveis pela regulação dos processos biológicos.
- O aumento da expressão proteica da Proteína de reparo de DNA, é uma das formas do parasita manter o ciclo vital quando submetidos a ação do PS-UA.
- Maiores estudos serão necessários para a identificação dos *spots* proteicos exclusivos (grupo controle e tratado) para elucidar ainda mais o mecanismo de ação.

4 REFERÊNCIAS

1. World Health Organization. Leishmaniasis Home Page. World Health Organization. Available: <http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>, acesso em: 12/jan/2017.
2. LAINSON R, RANGEL EF. *Lutzomyia longipalpis* and the eco-epidemiology of American visceral leishmaniasis, with particular reference to Brazil: a review. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 101: 117–118, 2006.
3. MORENO MS, CONTRERAS FG, NAVARRO P, MARÍN C, RAMÍREZ-MACÍAS, I, OLMO F, SANZ AM, CAMPAYO L, CANO C, YUNTA MJ. In vitro leishmanicidal activity of imidazole- or pyrazole-based benzo[g]phthalazine derivatives against *Leishmania infantum chagasi* and *Leishmania braziliensis* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 67: 387–397, 2012.
4. SUNDAR S, OLLIARO PL. *Ther. Clin. Risk Managem*, 3:733, 2007.
5. BRAY PG, BARRET MP, WARD SA, KONING HP. *Trends Parasitol*, 19: 232, 2003.
6. MAAROUF M, De KOUCHKOVSKY Y, BROWN S, PETIT PX, ROBERT-GERO M. *In vivo* interference of paromomycin with mitochondrial activity of *Leishmania*. *Experimental Cell Research*, 232:339, 1997.
7. SHALEV M, KONDOB J, KOPELYANSKIYC D, JAFFEC CL, ADIRA N, BAASOV T. Identification of the molecular attributes required for aminoglycoside activity against *Leishmania*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 110:13333, 2013.
8. BEZERRA JL, COSTA GC, LOPES TC, CARVALHO ICDS, PATRÍCIO FJ, SOUSA SM, AMARAL FMM, REBELO JMM, GUERRA RNM, RIBEIRO MNS, NASCIMENTO FRF. Avaliação da atividade leishmanicida in vitro de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacologia*, 16: 631-637, 2006.
9. INGOLSDÓTTIR, K. Usnic acid. *Phytochemistry*, 61(7): 729-736, 2002.
10. JIN J-Q RY, BIAN XL, ZENG AG, YANG GD. Solubility of (+)-Usnic Acid in Water, Ethanol, Acetone, Ethyl Acetate and n-Hexane. *Journal of Solution Chemistry*, 42:1018–1027 2013.
11. HAN D, MATSUMARU K, RETTORI D, KAPLOWITZ N. Usnic acid-induced necrosis of cultured mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress. *Biochemical pharmacology*, 67: 439–451, 2004.
12. GUO L. et al. Review of usnic acid and *Usnea barbata* toxicity. *Journal of Environmental Science and Health, Part C*, 26: 317–338, 2008.

13. THIEL M, BRUCHHAUS I. Comparative proteome analysis of *Leishmania donovani* at different stages of transformation from promastigotes to amastigotes. *Med Microbiol Immunol*, 190:33-36, 2001.
14. ZHAO Y, JENSEN OE. Modification-specific proteomics: Strategies for characterization of post-translational modifications using enrichment techniques. *Proteomics* 9, (20):4632-4641, 2009.
15. PAGEL O, LOROCH S, SICKMANN A, ZAHEDI RP. Current strategies and findings in clinically relevant post-translational modification-specific proteomics. *Expert Rev Proteomics* 12(3):235-253, 2015.
16. CHENIK M, LAKHAL S, BEN KHALEF N, ZRIBI L, LOUZIR H et al. Approaches for the identification of potential excreted/secreted proteins of *Leishmania major* parasites. *Parasitology*, 132: 493–509, 2006.
17. PAAPE D, BARRIOS-LERENA ME, LE BIHAN T, MACKAY L, AEBISCHER T Gel free analysis of the proteome of intracellular *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol*, 169: 108–114, 2010.
18. DRUMMELSMITH J, BROCHU V, GIRARD I, MESSIER N, OUELLETTE M. Proteome mapping of the protozoan parasite *Leishmania* and application to the study of drug targets and resistance mechanisms. *Mol Cell Proteomics*, 2: 146–155, 2003.
19. ODABASOGLU F, CAKIR A, SULEYMAN H, ASLAN A, BAYIR Y, et al. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *J Ethnopharmacol*, 103: 59–65, 2006.
20. ASAHINA Y, SHIBATA S. Chemistry of lichen substances, first ed. Japan Society for the Promotion of Science, 1954.
21. DAMERVAL C, VIENNE D, DEZIVY M, THIELLEMENT H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*, Weinheim, Germany, 7:52-54, 1986.
22. RABILLOUD T, ADESSI C, GIRAUDÉL A, LUNARDI J. Improvement of the solubilization of proteins in two-dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients. *Electrophoresis*, 18,307-316,1997.
23. BRADFORD MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochemistry*,72:248-254,1976.
- 24.LAEMMLI UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*. 227(5259):680-685,1970.
- 25.SHEVCHENKO A, TOMAS H, HAVLI J, OLSEN JV, MANN M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nat Protoc*. 1(6):2856–60, 2007.

26. WEISS W, GORG A. Two-dimensional electrophoresis for plant proteomics. *Methods Mol Biol*, 355:121-143, 2007.
27. IWAI SA, ISHIJI I, MABCHI KA, SUTOH. Novel actin-bundling kinesin-related protein from *Dictyostelium discoideum*. *J. Biol. Chem.* 6:4696–4704, 2004.
28. BURNS JM JR., SHREFFLER WG, BENSON DR, GHALIB HW, BADARO R, REED SG. Molecular characterization of a kinesin-related antigen of *Leishmania chagasi* that detects specific antibody in African and American visceral Leishmaniasis. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 90:775–779, 1993.
29. SIVAKUMAR RP, SHARMA KP, CHANG, SINGH S. Cloning, expression and purification of a novel recombinant antigen *Leishmania donovani*. *Protein Expr. Purif*, 46:156–165, 2006.
30. KULL FJ, SABLIN EP, FLETTERICK RJ, VALE RD. Crystal structure of the kinesin motor domain reveals a structural similarity to myosin. *Nature*, 380:50-555, 1996.
31. ZIEGELBAUER K, MULTHAUP G, OVERATH P. Molecular characterization of two invariant surface glycoproteins specific for the bloodstream stage of *Trypanosoma brucei*. *Journal of Biological Chemistry*, 267: 10797–10803, 1992.
32. GENOIS MM., PAQUET ER., LAFFITTE MCN, MAITY R, RODRIGUES A, OUELLETTE M, MASSONA JY. DNA Repair Pathways in Trypanosomatids: from DNA Repair to Drug Resistance. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 78:40-73, 2014.
33. BATTERS C, ELLRICH H, HELBIG C, WOODALL KA, HUNDSCHHELL C, BRACK, D, VEIGEL C. Calmodulin regulates dimerization, motility, and lipid binding of *Leishmania* myosin XXI. *Proc Natl Acad Sci*, 14:111(2), 2014.
34. LIANG SH, HARITAN A, ULIEL S, MICHAEL S. Trans and cis splicing in trypanosomatids: mechanism, factors, and regulation. *Eukaryot Cell*, 2:830-840, 2003.
35. MARQUES, MCP, POMPÍLIO ONM. **Análise da expressão e investigação de mecanismos envolvidos com o controle da atividade de homólogos do fator de iniciação da tradução eIF4E ao longo do ciclo de vida de *Leishmania amazonensis*.** 2008. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Genética, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2008.
36. GAVIN AC, ALOY P, GRANDI P, KRAUSE R, BOESCHE M, MARZIOCH M, RAU, C, JENSEN, LJ, BASTUCK S, DÜMPFELFELD, B. Proteome survey reveals modularity of the yeast cell machinery. *Nature*, 440:631–636, 2006.
37. SZKLARCZYK D, FRANCESCHINI A, WYDER S, FORSLUND K, HELLER D, HUERTA-CEPAS J, SIMONOVIC M, ROTH A, SANTOS A, TSAFOU KP, KUHN M, BORK P, JENSEN LJ, VON MERING C. STRING v10: protein-protein interaction networks, integrated over the tree of life. *Nucleic Acids Res.* 43(Database issue): D447-52, 2015.

38. NEGRUTSKII BS, EL'SKAYA AV. Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha: Structure, expression, functions, and possible role in aminoacyl-tRNA channeling. *Prog. Nucleic Acid Res. Mol. Biol.* 60: 47–78. 1998.
39. HERMIAKOB H, MONTECCHI-PALAZZI L, LEWINGTON C, MUDALI S, KERRIEN S, ORCHARD S, VINGRON M, ROECHERT B, ROEPSTORFF P, VALENCIA A, et al. IntAct: An open source molecular interaction database. *Nucleic Acids Res.* 32:D452-D455, 2004.
40. KARP G. The cytoskeleton and cell motility. In: *Cell and Molecular Biology Concepts and Experiments*. 5th ed. New York: Wiley. p. 344-412, 2007.
41. JOHNSON K, NDJAMEN B, KIMA PE. Effects of Cytoskeleton-inhibiting Drugs on *Leishmania amazonensis* Development in Macrophages. *Journal of Undergraduate Research*, 12, (3), 2011.
42. SEEBECK F, HEMPHILL A, LANSON D. The cytoskeleton of trypanosomes. *Parasitol Today*, 6: 49-52, 1990.
43. DAGGER F, DUNIA I, HERNANDEZ AG, PRADEL LA, BENEDETTI EL. Plasma membrane and cytoskeletal constituents in *Leishmania mexicana*. *Mol Biol Rep*, 13:197-206, 1989.
44. HEMPHILL A, AFFORTER M, SEEBECK T 1992. A novel microtubule-binding motif identified in a high molecular weight microtubule-associated protein from *Trypanosoma brucei*. *J Cell Biol*, 117: 95-103, 1992.
45. HERNANDEZ C El. citoesqueleto de *Leishmania* y su susceptibilidad a drogas antimicrotubulos, PhD Thesis, Universidad Central de Venezuela, Caracas, 139, 1996.
46. NAYAK RC, SAHASRABUDDHE A, BAJPAI V, GUPTA CM. A novel homologue of coronin colocalizes with actin in filament-like structures in *Leishmania*. *Mol Biochem Parasitol*, 143: 152-164, 2005.
47. KIMBALL, S. Eukaryotic initiation factor eIF2. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 31:25-29, 1999.
48. HINNEBUSCH AG, LORSCH JR. The mechanism of eukaryotic translation initiation: New insights and challenges. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 4:1–25, 2012.
49. EJIRI, S. Moonlighting functions of polypeptide elongation factor 1: from actin bundling to zinc finger protein R1-associated nuclear localization. *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*, 66:1-21, 2002.
50. NANDAN, D., YI, T., LOPEZ, M., LAI, C., REINER, N.E. *Leishmania* EF-1alpha activates the Src homology 2 domain containing tyrosine phosphatase SHP-1 leading to macrophage deactivation. *J. Biol. Chem.* 277:50190–50197, 2002.
51. VICENS Q, WESTHOF E. Crystal structure of paromomycin docked into the eubacterial ribosomal decoding A site. *Structure*, 9:647, 2001.
52. ZIEGELBAUER K, OVERATH P. Organization of Two Invariant Surface Glycoproteins in the Surface Coat of *Trypanosoma brucei*. *Infection and Immunity*, 61:4540-4545, 1993. ³⁰

5 CONCLUSÕES

- O PS-UA apresentou uma maior eficácia ao compararmos com o AU, quanto à sua atividade leishmanicida.
- Quanto à sua atividade citotóxica, o PS-UA foi sete vezes menos tóxico para os macrófagos RAW 267.4
- Com relação ao aspecto ultraestrutural das formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, o PS-UA causou severas alterações quando comparado ao AU, como modificações na cromatina nuclear, intumescimento mitocondrial e intensa vacuolização citoplasmática, além de presença de vesículas eletro-densas espalhadas por todo o citoplasma.
- No tocante ao aspecto morfológico das formas promastigotas de *L. (L.) infantum chagasi*, o AU e o PS-UA, ambos apresentam um mesmo efeito, desestabilizando a membrana plasmática dos parasitas, com modificação da forma alongada para arredondada.
- Na análise proteômica, o PS-UA apresentou um mecanismo de ação semelhante a fármacos de 2ª escolha como a paromomicina, inibindo a síntese proteica e agindo em proteínas responsáveis pela regulação dos processos biológicos.

6 PERSPECTIVAS

Em função dos resultados obtidos, consideramos o usnato de potássio um promissor agente leishmanicida e neste contexto temos a pretensão de:

- Identificar proteínas exclusivas do extrato proteico das formas promastigotas de *Leishmania (L) infantum chagasi*, procurando elucidar outros mecanismos de ação do usnato de potássio semelhantes a de alguns fármacos utilizados na terapêutica.
- Realizar ensaios *in vivo*, buscando fórmulas farmacêuticas eficazes no tratamento dessa doença.
- Oferecer uma nova opção terapêutica para o tratamento das leishmanioses, atendendo principalmente as populações carentes.

REFERENCIAS

- ABO-KHATWA, A. N.; AL-ROBAI, A. A.; AL-JAWHARI, D. A. Lichen acids as uncouplers of oxidative phosphorylation of mouse-liver mitochondria. *Natural Toxins*, 4: 96-102, 1996.
- AHTI, T.; STENROOS, S.; XAVIER FILHO, L. The lichen family Cladoniaceae in Paraíba, Pernambuco and Sergipe, Northeast Brasil. *Tropical Bryology*, 7:55-70, 1993.
- ARAÚJO, H.D.A.; SILVA JR., J.G.; SATURNINO OLIVEIRA J.R.; RIBEIRO, H.M.L.; MARTINS, M.C.B.; CAVALCANTI, M.B.; LIMA, A. A.; ALBUQUERQUE, C.P.A.; MELO-JÚNIOR M.R.; PONTES FILHO N.T.; PEREIRA, E.C.; SILVA, D.J.R.; DOS ANJOS, J.V.; FALCÃO, E.P.S.; SILVA, N.H.; LIMA, V.L.M.; Usnic Acid Potassium Salt: Evaluation of the Acute Toxicity and Antinociceptive Effect in Murine Model. *Molecules*, 24(11) 2019.
- ASAHINA, Y.; SHIBATA, S. Chemistry of lichen substances, Japan Society for the Promotion of Science, 1954.
- BEZERRA, J.L.; COSTA, G.C.; LOPES, T.C.; CARVALHO, I.C.D.S.; PATRÍCIO, F.J.; SOUSA, S.M.; AMARAL, F.M.M.; REBELO J.M.M.; GUERRA, R.N.M.; RIBEIRO, M.N.S.; NASCIMENTO, F.R.F. Avaliação da atividade leishmanicida *in vitro* de plantas medicinais. *Revista Brasileira de Farmacologia*, 16: 631-637, 2006.
- BEZIVIN, C.; TOMASI, S.; ROUAUD, I.; DELCROS, J.G.; BOUSTIE, J. Cytotoxic activity of compounds from the lichen: *Cladonia convolute*. *Planta Medica*, 70: 874–877, 2004.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochemistry*, 72: 248-254, 1976.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância Epidemiológica. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. Brasília: Ministério da Saúde, 2016.
- CAMARGO, L. M. A.; BARCINSKY, M.A. Leishmanioses, Feridas Bravas e Kalazar. *Ciência e Cultura, Endemias/Artigos*. São Paulo, 55(1): 34-37, 2003.
- CAMPANELLA, L.; DELFINI, M.; ERCOLE, P.; IACOANGELI, A.; RISULEO, G. Molecular characterization and action of usnic acid: a drug that inhibits proliferation of mouse polyomavirus in vitro and whose main target is RNA transcription. *Biochimie*, 84: 329–334, 2002.
- CARDARELLI, M.; SERINO, G.; CAMPANELLA, L.; ERCOLE, P.; DE CICCO NARDONE, F.; ALESIANI, O.; ROSSIELLO, F. Antimitotic effects of usnic acid on different biological systems. *Cellular and molecular life sciences*, 53: 667-672, 1997.
- CETIN, H.; TUFAN-CETIN, O.; TURK, A. O.; TAY, T.; CANDAN, M.; YANIKOGLU, A.; SUMBUL, H. *Parasitol. Res.*, 102:1277-1279, 2008.
- CETIN, H.; TUFAN-CETIN, O.; TURK, A. O.; TAY, T.; CANDAN, M.; YANIKOGLU, A.; SUMBUL, H. *Nat. Product Res.*, 26:350-355, 2011.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; RIJAL, S.; PEELING, R.W.; ALVAR, J.; BOELAERT, M. Visceral leishmaniasis: what are the needs for diagnosis, treatment and control? *Nature Reviews Microbiology*, 5: 873–882, 2007.

CHAN, J.; FUJIWARA, T.; BRENNAN, P.; McNEIL, M.; TURCO, S.J.; SIBILLE, J.-C.; SNAPPER, M.; AISEN, P.; BLOOM, B. R. *Proceedings of the National Academic Sciences*, 86: 2453-2457, 1989.

CHAKRABORTY, A. K.; MAJUMDER, H. K. Mode of action of pentavalent antimonials: specific inhibition of type I DNA topoisomerase of *Leishmania donovani*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 152(2): 605-611, 1988.

CHENIK, M.; LAKHAL, S.; BEN KHALEF, N.; ZRIBI, L.; LOUZIR, H. Approaches for the identification of potential excreted/secreted proteins of *Leishmania major* parasites. *Parasitology*, 132: 493–509, 2006.

COCCHIETTO, M.; SKERT, N.; NIMIS, P.L.; SAVA, G. A review on usnic acid, an interesting natural compound. *Naturwissenschaften*, 89: 137–146, 2002.

CROFT, S.L.; BARRETT, M.P.; URBINA, J.A. Chemotherapy of trypanosomiasis and leishmaniasis. *Trends in Parasitology*, 21(11):508-512, 2005.

CROFT, S.L.; SUNDAR, S.; FAIRLAMB, A.H. Drug resistance in leishmaniasis. *Clin Microbiol Rev.* 19(1):111-126, 2006.

CULBERSON, C.F. Chemical and botanical guide to lichen products. University of North Carolina Press, Chapel Hill. N.C, 1969.

CUNNINGHAM, M. L. AND FAIRLAMB, A. H. *European Journal Biochemistry*, 230: 460-468, 1995.

CURD F.H.; ROBERTSON, A.; STEPHENSON, R. Lichen acids. Part IV. Atranorin. *J chem Soc*, 0:130-3, 1933.

CURNUTTE, J.T. Superoxide production by phagocytic leukocytes: the scientific legacy of Bernard Babior. *The Journal of Clinical Investigation*, 8:1054-1057, 2004.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J.; SACKS, D. L.; MATLASHEWSKI, G. *Journal Immunology*, 146: 2747-2753, 1991.

19. DAMERVAL, C.; VIENNE, D.; DEZIVY, M.; THIELLEMENT, H. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins. *Electrophoresis*, Weinheim, Germany, 7:52-54, 1986.

DESCOTEAUX, A.; TURCO, S. J. Glycoconjugates in *Leishmania* infectivity. *Biochimica et Biophysica Acta*, 2-3:341-352, 1999.

DE CARVALHO, E. A. B.; ANDRADE, P.P.; SILVA, N.H.; PEREIRA, E.C.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q. Effect of usnic acid from the lichen *Cladonia substellata* on *Trypanosoma cruzi* *in vitro*: an ultrastructural study. *Micron*, 36: 155–161, 2005.

ELO, H.; MATIKAINEN, J.; PELTTARI, E. Potent activity of the lichen antibiotic (+)-usnic acid against clinical isolates of vancomycin-resistant enterococci and methicillin-resistant *Staphylococcus aureus*. *Die Naturwissenschaften*, v. 94, n. 6, p. 465–8, 2007.

ELIX J.A. Biochemistry and secondary metabolites. In: Thomas JN. *Lichen Biology*. Cambridge University Press, Cambridge, 154–180, 1996.

FAHSELT, D. Secondary biochemistry of lichens. *Symbiosis* 16: 117–165, 1994.

FRANCOLINI; NORRIS, P.; PIOZZI, A.; DONELLI, G.; AND STOODLEY, P. Usnic acid, a natural antimicrobial agent able to inhibit bacterial biofilm formation on polymer surfaces. *Antimicrobial Agents e Chemotherapy*, 48(11): 4360, 2004.

FRIEDL, T.; BÜDEL, B. Photobionts. In: Nash TH. *Lichen Biology*. Cambridge University Press, Cambridge, 8-23, 1996.

FOURNET, A.; FERREIRA M. E.; ROJAS DE ARIAS, A.; TORRES DE ORTIZ, S.; INCHAUSTI, A.; YALUFF, G.; QUILHOT, W.; FERNANDEZ, E.; HIDALGO, ME. Activity of compounds isolated from Chilean lichens against experimental cutaneous leishmaniasis. *Comparative Biochemistry Physiology*, 111: 69-74, 1997.

GONTIJO, C.M.F.; MELO, M.N. Leishmaniose Visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. *Revista Brasileira de Epidemiologia*, 7(3): 338-349, 2004.

HALE, Jr., M.E. *The biology of lichens*. Edward Arnold Pub. London, 1983.

HALICI M.; ODABASOGLU F.; SULEYMAN H.; CAKIR A.; ASLAN A.; BAYIR Y. Effects of water extract of *Usnea longissima* on antioxidant enzyme activity and mucosal damage caused by indomethacin in rats. *Phytomedicine*, 12:656-662, 2005.

HAN, D.; MATSUMARU, K.; RETTORI, D.; KAPLOWITZ, N. Usnic acid-induced necrosis of cultured mouse hepatocytes: inhibition of mitochondrial function and oxidative stress. *Biochemical Pharmacology*, 2003.

HANDMAN E., BULLEN D.V. Interaction of *Leishmania* with the host macrophage. *Trends Parasitology*, 18: 332–334, 2002.

HOTEZ N. Control of neglected tropical diseases. *New England Journal of Medicine*, 357: 1018–1027, 2007.

HUNECK, S. The significance of lichens and their metabolites. *Naturwissenschaften*, 86: 559–570, 1999.

HUANG, Z.; ZHENG, G.; TAO, J.; RUAN, J. Anti-inflammatory effects and mechanisms of usnic acid. *Journal of Wuhan University of Technology-Mater*, 26:955-959, 2011

HYVÄRINEN, M.; KOOPMANN, R.; HORMI, O.; TUOMI, J. Phenols in reproductive and somatic structures of lichens: a case of optimal defence? *Oikos*, 91:371–375, 2000.

INGOLSDÓTTIR, K. Usnic acid. *Phytochemistry*, 61(7): 729-736, 2002.

ISMAIL, S. O.; SKEIKY, Y. A. W.; BHATIA, A.; OMARA-OPYENE, L. A.; AND GEDAMU, L. *Infect Immunology*, 62: 657–664, 1994.

IVANOVA, V.; BACKOR, M.; DAHSE, H. M.; GRAEFE, U. *Prep. Biochem. Biotechnol*, 40:377-388, 2010.

JARAMILLO, T.M.T. **Caracterização celular e imunológica da interação células dendríticas – *Leishmania braziliensis***. 2014.127 f., il. Dissertação (Mestrado em Patologia Molecular) – Universidade de Brasília, Brasília, 2014.

JIN, J.-Q.; HE, L.-C; DONG, Y.-L.; LI, C.-Q. *Zhongguo Yaoxue Zazhi*, 41:1546, 2006.

LAUTWERWEIN, M.M.; OETHINGER, K.; BELSNER, T.; PETERS, AND R. MARRE. *In vitro* activities of the lichen secondary metabolites vulpinic acid, (+)-usnic acid, and (-) usnic acid against aerobic and anaerobic microorganisms. *Antimicrobial Agents Chemotherapy*, 39: 2541-2543, 1995.

LAWREY, J.D. Lichen secondary compounds: evidence for a correspondence between ant herbivore and antimicrobial function. *Bryologist*, 92: 326–328, 1989.

LEE, N.; BERTHOLET, S.; DEBRABANT, A.; MULLER, J.; DUNCAN, R.; NAKHASI, HL. Programmed cell death in the unicellular protozoan parasite *Leishmania*. *Cell Death Differentiation*, 9: 53–64, 2002.

LLANO, G.A. Economic Use of Lichens. *Smithsonian Institute Publ*, 4040: 385-422, 1951.

MAYER, M.; O'NEILL, M.A.; MURRAY, K.E.; SANTOS-MAGALHÃES, N.S.; CARNEIRO-LEÃO, A.M.A.; THOMPSON, A.M.; APPLEYARD, V.C.L. Usnic acid: a non genotoxic compound with anti-cancer properties. *Anticancer Drugs*, 16: 805–809, 2005.

MARGARET, A.; PHILLIPS E SAMUEL, L.; STANLEY, JR. Quimioterapia das infecções por protozoários: amebíase, giardíase, tricomoniase, leishmaniose e infecções por outros protozoários. cap. 50. In: Goodman & Gilman As bases farmacológicas da terapêutica. AMGH Editora. 12 ed. p. 1419-1441, 2012.

MARTH, T.; KELSALL, B.L. Regulation of interleukin-12 by complement receptor 3 signaling. *Journal of Experimental Medicine*, 11:1987-1995, 1997.

MARTINS, M.C.B.; SILVA, M.C.; SILVA, L.R.S.; LIMA, V.L.M.; PEREIRA, E.C.; FALCAO, E.P.S.; MELO, A.M.M.A.; SILVA, N.H. Usnic acid potassium salt: an alternative for the control of *Biomphalaria glabrata* (Say, 1818). *PloS ONE*, 2014.

McCONVILLE, M.J.; HANDMAN, E. The molecular basis of *Leishmania* pathogenesis. *International Journal for Parasitology*, 10:1047-1051, 2007.

McCONVILLE, M.J.; TURCO, S. J.; FERGUSON, M.A.; SACKS, D.L. Developmental modification of lipophosphoglycan during the differentiation of *Leishmania major* promastigotes to an infectious stage. *EMBO Journal*, 10:3593-3600, 1992.

MISHRA, J.; SAXENA, A.; SINGH, S. Chemotherapy of leishmaniasis: past, present and future. *Curr. Med. Chem.* 14:1153-1169, 2007.

MONTE NETO, R.L.; SOUSA, L.M.A.; DIAS, C.S.; BARBOSA FILHO, J.M.; OLIVEIRA, M.R.; FIGUEIREDO, R.C.B.Q. Morphological and physiological changes in *Leishmania* promastigotes induced by yangambin, a lignan obtained from *Ocotea duckei*. *Experimental Parasitology*, 127(1): 215-21, 2011.

MORENO, M.S.; CONTRERAS, F.G.; NAVARRO, P. *et al.* In vitro leishmanicidal activity of imidazole- or pyrazole-based benzo[g]phthalazine derivatives against *Leishmania infantum* *chagasi* and *Leishmania braziliensis* species. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 67: 387–397, 2012.

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

MOSSER, D. M.; VLASSARA, H.; EDELSON, P. J.; CERAMI, A. *Leishmania* promastigotes are recognized by the macrophage receptor for advanced glycosylation endproducts. *The Journal of Experimental Medicine*, 1:140-145, 1987.

MOSSER, D.M.; EDELSON, P. J. The third component of complement (C₃) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major*. *Nature*, 6120:329-331, 1987.

NAKAMURA, C.V.; SANTOS, A.O.; VENDRAMETTO, M.C.; LUIZE, P.S.; DIAS FILHO, B.P.; CORTEZ, D.A.G.; NAKAMURA, T. U. Atividade anti-leishmania do extrato hidroalcoólico e de frações obtidas de folhas de *Piper Regnellii* (Miq.) C.DC. var. *pallenscens* (C.DC.) Yunck. *Revista Brasileira de Farmacologia*, 16(1): 61-66, 2006.

NASH, T.H. *Lichen Biology*. Cambridge University Press. 1^a ed. 303, 1996.

NOBUO, H. Environmental factors affecting the content of usnic acid in the lichen mycobiont of *Ramalina siliquosa*. *The Bryologist*, 94: 57–59, 1991.

NUNES, R.K. **Avaliação da atividade tripanocida e leishmanicida de produtos naturais da flora matogrossense**. Trabalho de Conclusão de Curso – Centro de Ciências Biológicas – CCB, Universidade Federal de Santa Catarina, 2008.

ODABASOGLU, F.; CAKIR, A.; SULEYMAN, H.; ASLAN, A.; BAYIR, Y. Gastroprotective and antioxidant effects of usnic acid on indomethacin-induced gastric ulcer in rats. *Journal of Ethnopharmacology*, 103: 59–65, 2006.

OLIVEIRA, A.F.M.; XAVIER, H.S.; SILVA, N.H.; ANDRADE, L.H.C. Screening cromatográfico de Acanthaceae Medicinais: *Justicia pectoralis* Jacq. e *J. gendarussa* Burm. *Revista Brasileira de Plantas Medicinais*, 3: 37-41, 2000.

OKUYAMA, E.; UMEYAMA, K.; YAMAZAKI, M.; KINOSHITA, Y.; YAMAMOTO, Y. Usnic acid and diffractaic acid as analgesic and antipyretic components of *Usnea diffracta*. *Planta Medica*, 61: 113–115, 1995.

PAGEL, O.; LOROCH, S.; SICKMANN, A.; ZAHEDI, R.P. Current strategies and findings in clinically relevant post-translational modification-specific proteomics. *Expert Rev Proteomics* 12(3):235-253, 2015.

PAAPE, D.; BARRIOS-LERENA, M.E.; LE BIHAN, T.; MACKAY, L.; AEBISCHER, T. Gel free analysis of the proteome of intracellular *Leishmania mexicana*. *Mol Biochem Parasitol*, 169: 108–114, 2010.

PERRY, N.B.; BENN, M.H.; BRENNAN, N.J.; BURGESS, E.J.; ELLIS, G.; GALLOWAY, D.J.; LORIMER, S.D.; TANGNEY, R.S. *Lichenologist*, 31:627-636, 1999.

PODTEROB, A. Chemical composition of lichens and their medical applications. *Pharmaceutical Chemistry Journal*, 42: 582–588, 2008.

PUENTES, S.M.; DA SILVA, R.P.; SACKS, D.L.; HAMMER, C.H.; JOINER, K.A. Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania* major promastigotes is due to release of C5b-9. *Journal of Immunology*, 12:4311-4316, 1990.

QUILHOT, W.; GUZMÁN, G. Factores que determinan la variabilidad de las concentraciones de los metabolitos liquenicos. *Revista Latinoamericana de Química*, 19:19-22, 1988.

ROBLEDO, S.; WOZENCRAFT, A.; VALENCIA, A.Z.; SARAIVA, N. Human monocyte infection by *Leishmania (Viannia) panamensis*. Role of complement receptors and correlation of susceptibility in vitro with clinical phenotype. *Journal of Immunology*, 152:1265-1276, 1994.

ROSENTHAL, E.; DELAUNAY, P.; JEANDEL, P.Y.; HAAS, H.; POMARES-ESTRAN, C.; MARTY, P. Liposomal amphotericin B as treatment for visceral leishmaniasis in Europe. *Med. Mal. Infect*, 39:741-744, 2009.

SANTOS, T.A.B.; YOSHIOKA, M.K.; MIYAGUI, M.L. Leishmaniose visceral. *PUBVET, Publicações em Medicina Veterinária e Zootecnia*. 2(25): 260, 2008. Disponível em: <http://www.pubvet.com.br/texto.php?id=260>.

SALLOUM, A. I. O.; LUCARINI, R.; TOZATTI, M. G.; MEDEIROS, J.; SILVA, M. L. A.; MAGALHÃES, L. G.; CUNHA, W. R. *Planta Med*, 78:1304, 2012.

SCIRPA, P.; SCAMBIA, G.; MASCIULLO, V.; BATTAGLIA, F.; FOTI, E.; LOPEZ, R.; VILLA, P.; MANCUSO, MALECORE, M. A zinc sulphate and usnic acid preparation used as postsurgical adjuvant therapy in genital lesions by human Papillomavirus. *Minerva Gynecology*, 51: 255–260, 1999.

SHANG, X.; MIAO, X.; Lv, H.; WANG, D.; ZHANG, J.; HE, H.; YANG, Z.; PAN, H. Acaricidal activity of usnic acid and sodium usnic acid against *Psoroptes cuniculi* in vitro. *Parasitology Research*, 113:2387-2390, 2014.

SHTRO, A.A.; ZARUBAEV, V.V.; LUZINA, O.A.; SOKOLOV, D.N.; KISELEV, O.I.; SALAKHUTDINOV, N.F. Novel derivatives of usnic acid effectively inhibiting reproduction of influenza A virus. *Bioorganic & Medicinal Chemistry*, 22:6826-6836, 2014.

SHIBATA, S.; TUKITA, T.; TAMURA, AND Y MIURA. Relation between chemical constitutions and antibacterial effects of usnic acid and derivates. *Japanese Medical Journal*, 1:152-155, 1948.

SI, K.; WEI, L.; YU, X.; WU, F.; LI, X.; LI, C.; CHENG, Y. Effects of (+)-usnic acid and (+)-usnic acid-liposome on *Toxoplasma gondii*. *Experimental Parasitology*, 166:68-74, 2016.

SHEVCHENKO, A.; TOMAS, H.; HAVLI, J.; OLSEN, J.V.; MANN, M. In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes. *Nature Protocol*, 1(6):2856–60, 2007.

SINDERMANN, H.; CROFT, S.L.; ENGEL K. R. *et al.* “Miltefosine (Impavido): the first oral treatment against *leishmaniasis*”. *Medical Microbiology and Immunology*, 193(4): 173–180, 2004.

SOKOLOV, N. D.; ZARUBAEV, V. V.; SHTRO, A. A.; POLOVINKA, M. P.; LUZINA, A. O.; KOMAROVA, I. N.; SALAKHUTDINOV, F. N.; KISELEV, I.O. Anti-viral activity of (-)-and (+)-usnic acids and their derivatives against influenza virus A(H1N1), *Bioorganic and Medicinal Chemistry Letters*, 22(23): 7060-7064, 2009.

THIEL, M.; BRUCHHAUS, I. Comparative proteome analysis of *Leishmania donovani* at different stages of transformation from promastigotes to amastigotes. *Med Microbiol Immunol*, 190:33-36, 2001.

VAN ZANDBERGEN, G.; BOLLINGER, A.; WENZEL, A.; KAMHAWI, S.; VOLL, R.; KLINGER, M.; MULLER, A.; HOLSCHER, C.; HERRMANN, M.; SACKS, D.; SOLBACH, W.; LASKAY, T. Leishmania disease development depends on the presence of apoptotic promastigotes in the virulent inoculum. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 37:13837-13842, 2006.

VICENTE, C. *Fisiologia de las Substâncias Liquênicas*. Madrid, 1975.

VIJAYAKUMAR, C.S.; VISWANATHAN, S.; REDDY, M.K.; PARVATHAVARTHINI, S.; KUNDU, A.B.; SUKUMAR, E. Anti-inflammatory activity of (+) -usnic acid. *Fitoterapia*, 71: 564–566, 2000.

WALKER, J.; SARAVIA N.G. Inhibition of *Leishmania donovani* promastigote DNA topoisomerase I and human monocyte DNA topoisomerases I and II by antimonial drugs and classical antitopoisomerase agents. *The Journal of parasitology*, 90(5): 1155-1162, 2004.

WANDERLEY, J.L.; BENJAMIN, A.; REAL, F.; BONOMO, A.; MOREIRA, M.E.; BARCINSKI, M.A. Apoptotic mimicry: an altruistic behavior in host/Leishmania interplay. *Brasilian Journal of Medical and Biological Research*, 6:807-812, 2006.

WHO, Leishmaniasis Home Page. World Health Organization. Disponível em: Fonte: http://gamapserv.who.int/mapLibrary/Files/Maps/Leishmaniasis_2013_VL.png. WHO.Acesso: 15/03/2017.

WHO. Report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis. WHO Technical Reports Series 949, 2010.

WHO. Report of a meeting of the WHO expert committee on the control of leishmaniasis. WHO Technical Reports Series 949, 2016.

WU, J.; ZHANG, M.; DING, D.; TAN, T.; YAN, B. Effect of *Cladonia alpestris* on *Trichomonas vaginalis* in vitro. Chinese Journal of Parasitology & Parasitic Disease, 13: 126–129, 1995.

KNOP, W. Chemisch-physiologische Untersuchung uber die Flechten. Justus Liebigs Ann Chem, 49:103-124, 2006.

KUPCHAN S. M.; KOPPERMAN H. L. Usnic acid: tumor inhibitor isolated from lichens. Experientia, 1: 625–752, 1975.

XAVIER-FILHO, L.; RIZZINI, C.T. Manual de Liquenologia Brasileiro, Recife, Universidade Federal de Pernambuco, 1976.

ZHAO, Y.; JENSEN, O.E. Modification-specific proteomics: Strategies for characterization of post-translational modifications using enrichment techniques. Proteomics 9, (20):4632-4641, 2009.

ZHAO, Y.; TAO, J.S.; ZHANG, T. Review of usnic acid Chin Trad Patent Med, 32:270-273, 2010.

ZUFFEREY, R.; MAMOUN, C. B. Choline transport in *Leishmania major* promastigotes and its inhibition by choline and phosphocholine analogues. Mol Biochem Parasitol, 125(1-2):127-134, 2002.