



UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

RENATA MONDÊGO DE OLIVEIRA

**Efeito leishmanicida do óleo essencial de *Vernonia brasiliiana* (L.) Druce (Asteraceae) em
*Leishmania infantum***

SÃO LUÍS - MA

2020

RENATA MONDÊGO DE OLIVEIRA

**Efeito leishmanicida do óleo essencial de *Vernonia brasiliana* (L.) Druce (Asteraceae) em
*Leishmania infantum***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia - RENORBIO, ponto focal Maranhão, como requisito parcial para obtenção do grau de Doutora em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia em Agropecuária

Orientadora: Profa. Dra. Ana Lucia Abreu Silva

Coorientador: Dr. Fernando Almeida de Souza

SÃO LUÍS - MA

2020

Ficha gerada por meio do SIGAA/Biblioteca com dados fornecidos pelo(a) autor(a).
Núcleo Integrado de Bibliotecas/UFMA

Mondêgo de Oliveira, Renata.

Efeito leishmanicida do óleo essencial de Vernonia
brasiliensis L. Druce Asteraceae em Leishmania infantum /
Renata Mondêgo de Oliveira. - 2020.

86 f.

Coorientador(a): Fernando Almeida-Souza.

Orientador(a): Ana Lucia Abreu-Silva.

Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em
Biotecnologia - Renorbio/ccbs, Universidade Federal do
Maranhão, São Luís, 2020.

1. Beta-cariofileno. 2. DH82. 3. Isobolograma. 4.
Leishmaniose. 5. Morte celular. I. Abreu-Silva, Ana
Lucia. II. Almeida-Souza, Fernando. III. Título.



Universidade Federal do Maranhão
Av. dos Portugueses, 1966, Cidade Universitária – 65080-805 São Luís-MA
Telefone (98) 3272- 9531 E-mail: renorbio@ufma.br
Homepage: <http://www.renorbio.org.br>

FOLHA DE APROVAÇÃO DE DEFESA DE TESE

ALUNA: Renata Mondêgo de Oliveira

TÍTULO DO PROJETO: Efeito leishmanicida do óleo essencial de *Vernonia brasiliiana* (L.) Druce (**Asteraceae**) em *Leishmania infantum*.

PROFESSORA ORIENTADORA: Ana Lúcia Abreu Silva

BANCA EXAMINADORA:

Prof^ª. Dr^ª. Ana Lúcia Abreu Silva – UEMA
(Presidente)

Prof^ª. Dr^ª. Kátia da Silva Calabrese – IOC (Titular)

Prof^ª. Dr^ª. Maria do Socorro de Sousa Cartágenes –
UFMA (Titular)

Prof^ª. Dr^ª. Joicy Cortez de Sá Sousa – UNICEUMA
(Titular)

Prof. Dr. Aracélio Viana Colares – UNILEÃO (Titular)

CONCEITO

APROVADA

APROVADA

APROVADA

APROVADA

APROVADA

ASSINATURA

DATA DA APROVAÇÃO: 22 de dezembro de 2020

HORÁRIO: 09:00h

*Aos meus pais, que me ensinaram desde cedo o valor da educação.
E me mostraram que, através dela, eu poderia conquistar todos os meus sonhos.*

*“Talvez não tenha conseguido fazer o melhor, mas lutei para que o melhor fosse feito.
Não sou o que deveria ser, mas, graças a Deus, não sou o que era antes”.*

Martin Luther King

AGRADECIMENTOS

Acima de tudo, agradeço ao Criador, por ter me concedido forças e saúde para conduzir essa jornada. Agradeço à Ti, Pai, por ser meu guia e luz no meu caminho. É principalmente por não ter permitido que eu desistisse. A Ti, toda honra e glória, para sempre.

Agradeço ao apoio incondicional da minha mãe, Graça Mondêgo, em toda e qualquer decisão profissional minha. Que sempre vibrou com minhas conquistas e me deu colo nos dias mais difíceis. A empolgação com que ela sempre falou sobre meu doutorado ou qualquer coisa que tratasse ao meu respeito foi meu combustível nos momentos mais difíceis.

Ao meu pai, Germano Oliveira (in memoriam), de quem herdei a disciplina, resiliência e teimosia que permitiram com que essa tese fosse concluída. Carrego o seu exemplo no peito, todos os dias.

À minha orientadora, Profa. Ana Lucia Abreu Silva. Após 10 anos de convivência, me faltam palavras para descrever tudo que a sua presença significa. Obrigada pelo voto de confiança, quando eu ainda era uma jovem garota interessada em pesquisa. Obrigada por confiar no meu trabalho, por acreditar que eu era capaz, por incentivar e permitir que eu traçasse meu próprio caminho. Muito do que conquistei devo a você e minha gratidão jamais conseguirá ser expressa em palavras.

Ao meu coorientador, Fernando Almeida de Souza. Agradeço o teu empenho em fazer as coisas acontecerem. Por cada conselho, cada palavra de incentivo, por estar presente em todos os momentos. Obrigada por acreditar em mim e no nosso trabalho, mesmo quando tudo dava (muito) errado. Você é um exemplo de profissional e pesquisador, do mais alto nível.

Ao Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia, da Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz – RJ), em nome da Dra. Kátia da Silva Calabrese, que sempre nos recebeu de braços abertos e permitiu a realização deste e outros trabalhos. Agradeço à toda equipe do laboratório por todo suporte logístico para a realização desta tese. E principalmente, agradeço aos amigos do LIMP, por terem tornado a rotina de trabalho e os dias em terras cariocas mais leves e divertidos: Flávia Cardoso, Sandy Pereira, Yasmin Rizk, João Victor Silva, Mariana Nabuco, Luzilene Maria, Lanne Pinheiro, Juan Matheus e Henrique Previtalli.

Aos amigos (antigos e novos) do Laboratório de Anatomopatologia, da Universidade Estadual do Maranhão, por todos esses anos de convivência. Agradeço a todos pela amizade e por me ensinarem o valor e a força do trabalho em equipe.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Maranhão, e ao seu corpo docente, por contribuírem em mais uma etapa da minha formação profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa de estudos, e à Fundação de Amparo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Científico e Tecnológico do Maranhão (FAPEMA), pelo auxílio financeiro.

À Joicy Cortez de Sá Sousa, a quem orgulhosamente chamo de amiga. Obrigada pela gentileza de permitir que eu desse continuidade a uma ideia que nasceu de você. Agradeço por todo apoio, toda ajuda ao longo desses anos, por ter ouvido pacientemente todas as minhas angústias, meus inúmeros áudios sobre “como é difícil trabalhar com essa planta”, por todas as conversas profissionais, que enriqueceram o nosso trabalho e por todos os conselhos. A Pesquisa e a Universidade ganham imensamente por ter uma pessoa como você.

Agradeço o apoio sincero dos meus amigos, que sempre tiveram uma palavra de incentivo e foram uma fonte inesgotável de sorrisos, tornando todo esse processo mais fácil: Scarleth Kevia, João Victor Aguiar, Higor Ferreira, Aarão Ataídes, Breno Glaessner, Allana Freitas, Wendel Moreira, Izaías Polary, Gabriela Bastos e Isadora Magalhães, minha eterna duplinha. Às minhas “irmãs do Rio” Ana Eliza Oliveira, Taynan Rosa e Lucélia França, que dividiram comigo, além de um apartamento, uma rotina, angústias e alegrias, que fizeram tudo valer a pena.

Obrigada!

RESUMO

O objetivo deste trabalho foi avaliar o efeito leishmanicida do óleo essencial de *Vernonia brasiliiana* (VBEO) em formas promastigotas de *Leishmania infantum*, seu mecanismo de ação e o efeito da sua associação com a droga padrão miltefosina. Folhas de *V. brasiliiana* foram coletadas na cidade de Santa Luzia, Maranhão, seguido de identificação botânica e depósito de exsicata. As folhas foram secas e submetidas ao processo de hidrodestilação, para obtenção do óleo essencial. A composição química do óleo essencial foi determinada por cromatografia gasosa-espectrometria de massas (CG-MS). As quantidades relativas dos compostos isolados foram calculadas a partir das áreas de pico da cromatografia gasosa. A atividade leishmanicida do óleo essencial foi avaliada em formas promastigotas de *L. infantum* e a citotoxicidade em macrófagos DH82 através do ensaio colorimétrico do MTT. Para identificação de alterações ultraestruturais, formas promastigotas de *L. infantum* foram tratadas com o IC₅₀ do óleo essencial e avaliadas por microscopia eletrônica de transmissão. Variações no potencial de membrana mitocondrial, na produção de espécies reativas de oxigênio e a análise de eventos apoptóticos foram determinados por citometria de fluxo. Para tal, parasitos tratados com o óleo essencial, na concentração do IC₅₀, foram incubados com os fluorocromos TMRE, H₂DCFDA e Anexina/Iodeto de propídio (PI), respectivamente. A combinação entre VBEO-miltefosina foi avaliada em formas promastigotas de *L. infantum*, pelo método do isoblograma modificado. Diferentes proporções das drogas foram testadas para calcular o índice de concentração inibitória fracionada e determinar a natureza da interação. Os resultados foram analisados estatisticamente pelo teste de Kruskal-Wallis seguido do pós-teste de Dunn. As análises foram realizadas pelo software GraphPad Prism 7, com diferenças consideradas significativas quando $p < 0,05$. O rendimento do óleo essencial foi de 0,1%. Os compostos majoritários do óleo foram sesquiterpenos, sendo o β -cariofileno (21,47%) o principal deles. Os ensaios de atividade contra formas promastigotas apontaram IC₅₀ de $39,01 \pm 1,080 \mu\text{g/mL}$. A concentração citotóxica (CC₅₀) foi de $63,13 \pm 1,211 \mu\text{g/mL}$, mostrando que o óleo é menos tóxico para células do que para os parasitos. A atividade leishmanicida do óleo essencial foi evidenciada através das alterações estruturais visualizadas nas formas promastigotas, como aumento de volume mitocondrial, presença de vesículas na bolsa flagelar, descontinuidade da membrana nuclear, fragmentação e condensação do núcleo e perda de organelas citoplasmáticas. VBEO diminuiu o potencial de membrana mitocondrial, aumentou a produção de espécies reativas de oxigênio em promastigotas de *L. infantum*, com consequente indução de morte celular por apoptose tardia. A combinação óleo essencial-miltefosina demonstrou efeito antagônico, com índice de concentração inibitória fracionária igual a 4,779. Este trabalho demonstra a atividade anti-*Leishmania* de VBEO contra promastigotas de *L. infantum*.

Palavras-chave: β -cariofileno, DH82, isoblograma, leishmaniose, morte celular, óleo essencial.

ABSTRACT

The aim of this work was to evaluate the leishmanicidal effect of *Vernonia brasiliensis* essential oil (VBEO) in promastigote forms of *Leishmania infantum*, its mechanisms of action and the effect of its association with the standard drug miltefosine. *V. brasiliensis* leaves were collected in the city of Santa Luzia, Maranhão, followed by botanical identification, and voucher specimen deposit. Leaves were dried and submitted to hydrodistillation process, for the obtention of the essential oil. The chemical composition was determined through gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The relative amounts of individual compounds were computed from GC peak areas. The antileishmanial activity against *L. infantum* promastigotes and cytotoxicity on DH82 macrophages were evaluated by MTT colorimetric assay. To identify ultrastructural changes, promastigote forms of *L. infantum* were treated with VBEO IC₅₀ and evaluated by transmission electron microscopy. Variations in the mitochondrial membrane potential, in the production of reactive oxygen species, and analyses of apoptosis were determined by flow cytometry. Parasites treated with VBEO at IC₅₀ concentration were incubated with TMRE, H₂DCFDA and Annexin/Propidium iodide (PI), respectively. The combination between VBEO-miltefosine was evaluated in *L. infantum* promastigote forms by the modified isobologram method. Different proportions of both drugs were tested to calculate the fractional inhibitory concentration index and determine the nature of interaction. The results were analyzed statistically by Kruskal-Wallis test followed by Dunn's posttest. Analyses were performed with the software GraphPad Prism 7 and differences were considered significant when $p < 0.05$. The yield of the essential oil was 0.1%. The major compound of the essential oil was the sesquiterpene β -caryophyllene (21.47%). Anti-*Leishmania* assays indicated an IC₅₀ against promastigote forms of $39.01 \pm 1.080 \mu\text{g/mL}$. The CC₅₀ was $63.13 \pm 1.211 \mu\text{g/mL}$, showing that VBEO is less toxic to cells than to parasites. The antileishmanial action of the essential oil was evidenced by ultrastructural alterations found in promastigote forms, as kinetoplast swelling, occurrence of vesicles in the flagellar pocket, discontinuity of the nuclear membrane, nuclear fragmentation and condensation, and loss of cytoplasmic organelles. VBEO decreased mitochondrial membrane potential and increased the production of reactive oxygen species in *L. infantum* promastigotes, with consequent cell death due to late apoptosis. The combination of the essential oil and miltefosine showed an antagonistic effect, with a fractional inhibitory concentration index equal to 4.779. This study demonstrates the anti-*Leishmania* activity of VBEO against *L. infantum* promastigotes.

Keywords: β -caryophyllene, cell death, essential oil, DH82, isobologram, leishmaniasis.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Atividades biológicas de espécies de <i>Vernonia</i> descritas na literatura (2014-2020)	40
Tabela 2. Espécies de <i>Vernonia</i> com atividade leishmanicida	47

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Papel das moléculas de superfície gp63 e LPG na evasão da resposta imune causada por *Leishmania*. 20

LISTA DE ABREVIATURAS

acetil-CoA – acetilcoenzima A
ANVISA – Agência Nacional de Vigilância Sanitária
APC – Células apresentadoras de antígenos
C3b – Componente 3 do complemento
C5b-C9 – Complexo de ataque à membrana
CCR4 – Receptor de quimiocina C-C tipo 4
CCR6 – Receptor de quimiocina C-C tipo 6
CD – Grupo de diferenciação celular
CLWG – *Canine Leishmaniasis Working Group*
CR3 – Receptor do complemento 3
DMAPP – Dimetilalil pirofosfato
DXP – 1-desoxilulose 5-fosfato
ERO – Espécies reativas de oxigênio
Fas/FasL – Sistema Fas-Fas ligante
FOXP3 – Proteína *forkhead box P3*
GA-3P – Gliceraldeído 3-fosfato
GATA3 – Proteína de Ligação GATA 3
GP63 – Glicoproteína 63
GPI – Glicosilfosfatidilinositol
GSPL – Glicosfingofosfolípido
iC3b – Componente 3 do complemento inativo
IC₅₀ – Concentração inibitória em 50%
IL – Interleucina
IFN – Interferon
IPP – Isopentenil pirofosfato
IRIS – *International Renal Interest Society*
ISP – Inibidores da serino protease
LIT – Transportador de ferro de *Leishmania*
LPG – Lipofosfoglicano
LRV1 – Vírus de RNA de *Leishmania*
LV – Leishmaniose visceral
LVC – Leishmaniose visceral canina

LYST – Regulador do tráfego lisossômico

MAPA – Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento

MDR-1 – Proteína de resistência a múltiplos fármacos

MEP – Metileritritol fosfato

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

MS – Ministério da Saúde

MVA – Ácido mevalônico

NET – Armadilhas extracelulares de neutrófilos

NO – Óxido nítrico

Nramp1 – Proteína 1 macrofágica associada à resistência natural

OE – Óleo essencial

OMS – Organização Mundial da Saúde

P8GLC – Complexo proteoglicolipídico de *Leishmania*

PAL – Fenilalanina amônia liase

PAMP – Padrões moleculares associados a patógenos

PCR – Reação em cadeia da polimerase

pH – Potencial hidrogeniônico

PKR – Proteína quinase dependente de RNA

RNA – Ácido ribonucleico

ROR γ t – Receptor órfão relacionado ao ácido retinóico (subfamília γ t)

SOCS – Supressores da sinalização de citocinas

SUS – Sistema Único de Saúde

Tbet – Proteína T-box expressa em células T

TGF – Fator de transformação do crescimento

Th – Células T auxiliaadoras

TLR – Receptores do tipo *Toll*

TNF – Fator de necrose tumoral

T NK – Células T Natural Killer

TRAF6 – Fator 6 associado ao receptor do fator de necrose tumoral

Treg – Células T reguladoras

TRIF – Domínio TIR contendo proteína adaptadora indutora de IFN β

V-ATPase – ATPase vacuolar

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	16
2.1 Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Visceral	16
2.2 A imunologia da infecção por <i>Leishmania</i>	18
2.2.1 Mecanismos de evasão de <i>Leishmania</i>	18
2.2.1.1 O sistema complemento	18
2.2.1.2 Neutrófilos e a estratégia do “cavalo de Tróia”	21
2.2.1.3 Sobrevivência no interior do macrófago	22
2.2.1.4 Alteração das vias dos receptores tipo Toll	23
2.2.2 Resposta do hospedeiro frente à infecção	24
2.2.2.1 Células T CD4+	25
2.2.2.2 Células T CD8+	26
2.2.2.3 Células Th17	26
2.2.2.4 Células T regulatórias	26
2.2.2.5 Células T Natural Killer (T NK)	27
2.3 Manifestações clínicas da LVC	27
2.4 Tratamento da LVC	29
2.5 Tratamentos alternativos: o uso de plantas medicinais	32
2.6 Óleos essenciais	33
2.6.1 Composição química	35
2.6.1.1 Terpenos e terpenoides	35
2.6.1.2 Compostos aromáticos e alifáticos	36
2.7 Óleos essenciais e leishmaniose	37
2.8 O gênero <i>Vernonia</i>	38
3. OBJETIVOS	
3.1 Geral	48
3.2 Específicos	48
4 CAPÍTULO 1. <i>Vernonia brasiliiana</i> (L.) Druce induces ultrastructural changes and apoptosis-like death of <i>Leishmania infantum</i> promastigotes	49
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	62
REFERÊNCIAS	63

1 INTRODUÇÃO

Por ser uma das endemias parasitárias de maior importância em termos de saúde pública no mundo, a leishmaniose possui um amplo espectro de manifestações clínicas, desde lesões cutâneas, capazes de regredir espontaneamente, até a forma sistêmica, grave e potencialmente fatal caso não seja tratada (KEDZIERSKI, 2011; OLIVEIRA-RIBEIRO *et al.*, 2017).

Pacientes humanos e caninos podem permanecer assintomáticos por um longo período, mas parte pode desenvolver sinais clínicos compatíveis com a infecção. Vale ressaltar que o estabelecimento ou não da infecção depende de uma série de fatores: do estado imunológico do hospedeiro vertebrado; da habilidade do parasito em infectar as células hospedeiras, sobrevivendo ao seu microambiente e suprimindo os mecanismos de resposta imune dos hospedeiros; e de componentes da saliva do inseto vetor, que possuem propriedades que facilitam o estabelecimento da infecção (BANETH e AROCH, 2008; BIFELD e CLOS, 2015).

Apesar dos avanços, ainda existe uma problemática muito grande a respeito do tratamento da doença, principalmente da leishmaniose visceral canina (LVC). No Brasil, de acordo com a Portaria Interministerial nº 1.426/2008, entre o Ministério da Saúde (MS) e o Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento (MAPA), o tratamento de cães só é permitido com medicamentos registrados no MAPA e que não sejam utilizados na terapêutica humana (BRASIL, 2008a). Apenas um produto atende tais condições e foi liberado para comercialização no país, o Milteforan™, cujo princípio ativo é a miltefosina (BRASIL, 2016). Em decorrência da escassez medicamentosa, faz-se necessário o desenvolvimento de novos fármacos para o tratamento da leishmaniose ou o aprimoramento de terapias com fármacos já existentes (DNDi, 2019).

O uso de plantas medicinais é uma alternativa terapêutica promissora, aliando o conhecimento farmacognóstico com pesquisas que visem comprovar cientificamente os efeitos terapêuticos das plantas. A própria Organização Mundial da Saúde (OMS) reconhece a importância dessa medicina tradicional, especialmente nos países em desenvolvimento (FORMAGIO *et al.*, 2013; WHO, 2013).

No Brasil, o Ministério da Saúde implementou em 2008 a Portaria Interministerial nº 2.960, que instituiu o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e criou o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos, que têm por objetivo ampliar as opções dos usuários do Sistema Único de Saúde (SUS) mediante uso sustentável de plantas (BRASIL, 2008b). Com isso, o SUS listou 71 espécies vegetais com potencial terapêutico, dentre elas, espécies do gênero *Vernonia* (BRASIL, 2009).

O gênero *Vernonia* é um dos mais numerosos e complexos da família Asteraceae, que é amplamente distribuído no planeta. O uso popular também é bastante disseminado, principalmente no continente africano e no Brasil (HATTORI e NAKAJIMA, 2008). Tradicionalmente conhecida como assa-peixe, as plantas deste gênero são usadas na medicina popular com as mais diversas finalidades, especialmente no tratamento de doenças respiratórias e infecções em geral (CORRÊA *et al.*, 2004). Diversos trabalhos comprovaram o potencial farmacológico de espécies de *Vernonia*, em especial *V. amygdalina*. No Brasil, *V. brasiliiana* tem grande importância medicinal, no entanto, os estudos sobre suas propriedades farmacológicas são centrados nos efeitos antiplasmódico e antibacteriano (CARVALHO *et al.*, 1991; ALVES *et al.*, 1997; MAIA *et al.*, 2010).

Trabalhos anteriores realizados por nosso grupo de pesquisa demonstraram que *V. brasiliiana* possui atividade leishmanicida promissora no modelo *in vitro*, em formas promastigotas de *L. amazonensis* (CORTEZ DE SÁ, 2015), o que nos abriu perspectivas para testes com a espécie *L. infantum*, causadora da LVC. Nosso grupo vem trabalhando com a fitoterapia, no intuito de testar formulações à base de plantas, que exerçam efeito direto sobre o parasito, levando à sua destruição, ou efeito indireto, por meio da modulação do sistema imunológico dos animais, o que pode acarretar também em uma melhor ação terapêutica de outros medicamentos. No panorama atual, tem-se a cidade de São Luís, hiperendêmica para LVC, com número crescente de animais com manifestações clínicas atípicas da doença. Do outro lado, tem-se a escassez de opções terapêuticas para cães, com apenas uma droga disponível no mercado. Diante destes fatores, aliada à disponibilidade de matéria vegetal, o objetivo deste trabalho foi avaliar a atividade leishmanicida do óleo essencial de *V. brasiliiana* em *L. infantum*.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Aspectos epidemiológicos da Leishmaniose Visceral

A Leishmaniose Visceral (LV) é uma zoonose negligenciada, que afeta principalmente as populações mais pobres e em maior situação de vulnerabilidade social e econômica (ALVAR *et al.*, 2006). É uma enfermidade infecciosa causada por protozoários do gênero *Leishmania*, não contagiosa e de caráter crônico, presente nos trópicos, subtropicais e regiões temperadas (ALVAR *et al.*, 2012).

Aproximadamente 350 milhões de pessoas em todo o mundo encontram-se sob risco de contrair a doença. Estima-se que entre 50 a 90 mil casos de LV ocorram mundialmente a cada ano, dos quais apenas 25 a 45% são relatados à OMS. Em 2017, mais de 95% dos casos notificados estavam restritos a apenas dez países: Bangladesh, Brasil, China, Etiópia, Índia, Quênia, Nepal, Somália, Sudão e Sudão do Sul (WHO, 2019).

Em uma perspectiva global, o Brasil é um dos principais focos de LV, com uma incidência anual média em 2017 de 2 casos para cada 100.000 habitantes (SINAN, 2018). No ano em questão, o país apresentou 3.987 casos confirmados (SINAN, 2019a) e, dentre as unidades federativas, os estados de Minas Gerais e Maranhão apresentaram os maiores quantitativos, com 781 e 709 casos, respectivamente (SINAN, 2019b; SINAN, 2019c).

Cães são considerados os principais reservatórios domésticos de *L. infantum*, agente etiológico da LVC, e a principal fonte de infecção do vetor. Por isso, a presença desses animais em áreas endêmicas representa um fator de risco para o desenvolvimento da doença humana (ALVES e BEVILACQUA, 2004). Análises espaço-temporais evidenciam que casos humanos tendem a estar mais concentrados em áreas com alta incidência de casos de LVC (TEIXEIRA-NETO *et al.*, 2014; WERNECK, 2014).

A principal forma de transmissão do parasito para os seres humanos e outros hospedeiros mamíferos é por meio da picada de flebotomíneos fêmeas infectadas. No Brasil, as principais espécies envolvidas na transmissão são *Lutzomyia longipalpis* e *Lu. cruzi* (SANTOS NOGUEIRA *et al.*, 2019).

As manifestações clínicas da LVC são variadas, com um amplo espectro de sinais clínicos não específicos. A maioria dos cães infectados não desenvolve a doença e vive sem nenhum sinal aparente (FOGLIA MANZILLO *et al.*, 2013), enquanto uma população mais

suscetível desenvolve sua forma mais severa. Animais infectados saudáveis servem como uma fonte parasitária marginal aos vetores. Por sua vez, os doentes são altamente infecciosos, em decorrência da resposta imune celular ineficaz e do parasitismo moderado a elevado, especialmente na pele (COURTENAY *et al.*, 2014).

No Brasil, apesar dos esforços do Ministério da Saúde, os casos de LV mais que dobraram durante o período de 1990-2016 (MARTINS-MELO *et al.*, 2018). As prováveis razões para este crescimento são a migração humana das áreas rurais para áreas urbanas, o estabelecimento de populações permanentes de flebótomos em localidades anteriormente livres, como consequência do êxodo rural, e o fluxo descontrolado de animais, com particular atenção para a circulação de cães errantes (ALVAR *et al.*, 2012; BELO *et al.*, 2015). Dada a disseminação da doença e o aumento do número de casos, é evidente que as medidas de controle aplicadas não são completamente adequadas (QUINNELL e COURTENAY, 2009).

Com o objetivo de reduzir a propagação da doença e os índices de mortalidade, o Ministério da Saúde estabeleceu o Programa de Vigilância e Controle da Leishmaniose Visceral (BRASIL, 2006), que se baseia em três estratégias: diagnóstico precoce e tratamento dos pacientes humanos; controle do vetor por meio de gestão ambiental e uso de inseticidas; e identificação e eutanásia do reservatório canino. No entanto, esta última estratégia é objeto de considerável controvérsia, tanto do ponto de vista ético como de eficácia (GONTIJO e MELO, 2004; BRASIL, 2014).

Estudos de modelagem matemática preveem que o programa de eliminação de cães soropositivos no Brasil deve ser eficaz em áreas de baixa e média, mas não de alta transmissão de *Leishmania* (COSTA *et al.*, 2013). Contudo, a prática permanece questionável pois, apesar da eutanásia de milhares de cães com infecção suspeita e confirmada a cada ano, o programa não obteve sucesso (DANTAS-TORRES *et al.*, 2012; SILVA *et al.*, 2018).

Há várias explicações para esta situação: a falta de profissionais qualificados causada por restrições financeiras, o que leva a atrasos nas coletas, na realização dos testes e na remoção dos cães soropositivos; falhas em identificar e remover o alto número de animais assintomáticos; a recusa de proprietários em cumprir as medidas de vigilância; a alta taxa de substituição dos animais eutanasiados por cães jovens, imunologicamente imaturos; e a falta de um teste diagnóstico preciso no local de atendimento (ZUBEN e DONALISIO, 2016).

Teoricamente, o controle vetorial seria a estratégia mais eficaz no combate à leishmaniose, mas sua implantação encontra grandes entraves, devido a problemas operacionais: o alto custo de manutenção da pulverização de inseticidas em larga-escala; o conhecimento limitado sobre a ecologia e biologia do vetor em áreas urbanas; e a necessidade de um extenso sistema de vigilância entomológica, que pudesse estimar o tamanho da população de vetores (MAIA-ELKHOURY *et al.*, 2008; RANGEL e VILELA, 2008).

O resultado da adoção de determinada medida de controle e prevenção da LV depende da variabilidade das taxas de transmissão do parasito. Por ser considerada uma doença em que as circunstâncias de transmissão dependem de fatores locais, a escolha das medidas de controle deve ser baseada no contexto específico para o qual será implementada (WERNECK, 2014).

2.2 A imunologia da infecção por *Leishmania*

Desde a entrada de formas promastigotas metacíclicas na corrente sanguínea do hospedeiro, após a picada do flebotomíneo, até sua transformação em amastigotas no interior dos macrófagos, a batalha entre o estabelecimento da doença e a eliminação do parasito depende de vários fatores: de componentes da saliva do inseto vetor; do estado imunológico do hospedeiro; e da capacidade de *Leishmania* em evadir-se da resposta imune (GUPTA *et al.*, 2013; BIFELD e CLOS, 2015).

2.2.1 Mecanismos de evasão de *Leishmania*

2.2.1.1 O sistema complemento

O sistema imunológico, na maioria dos eucariotos superiores, é dividido em inato e adaptativo. O sistema complemento é componente da imunidade inata e atua na eliminação de patógenos, favorecendo o processo de fagocitose. Consiste em pequenos precursores inativos de proteínas, presentes no sangue, que são ativados quando estimulados por antígenos. Quando elementos do complemento se ligam à superfície do patógeno ocorre quimiotaxia, opsonização, aglutinação e lise celular, através da formação de um complexo de ataque à membrana (BIFELD e CLOS, 2015).

As formas promastigotas de *Leishmania* aproveitam-se desse mecanismo de defesa para entrar no macrófago de maneira silenciosa, além disso, possuem em sua superfície dois

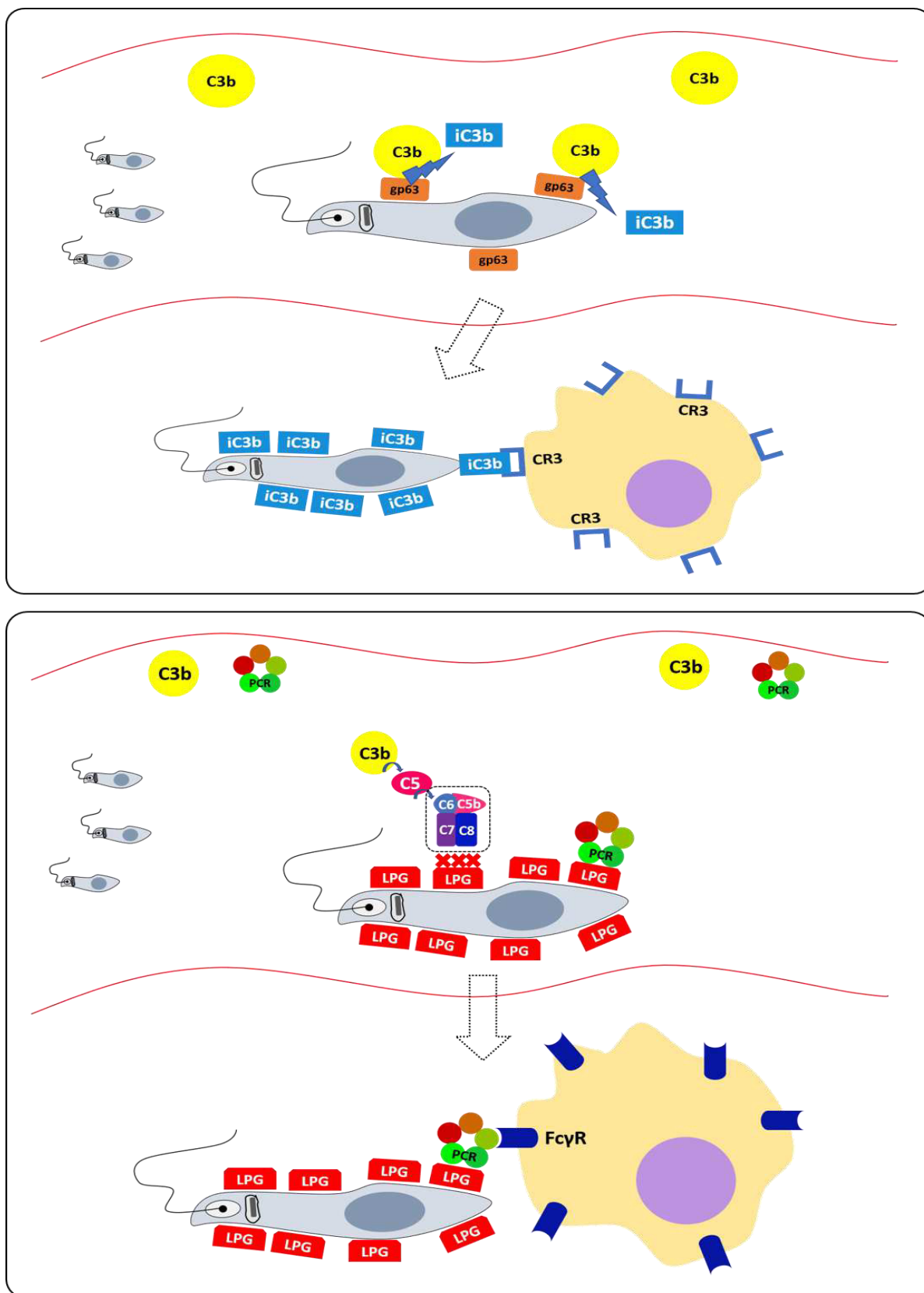
componentes que lhes conferem resistência ao complemento, a metaloprotease GP63 e o lipofosfoliglicano (LPG) (PUENTES *et al.*, 1990; BRITTINGHAM *et al.*, 1995).

A GP63 é uma enzima multifuncional relacionada com a inativação de componentes do sistema complemento. Ela inativa a proteína C3b em iC3b, o que inibe a formação do complexo C5 convertase (Figura 1). Além disso, iC3b funciona como uma opsonina e, ao ligar-se ao receptor do complemento 3 (CR3) presente nos macrófagos, diminui a produção de IL-12 e inibe o *burst* oxidativo, o que contribui para a sobrevivência do parasito (MOSSER e EDELSON, 1987; BRITTINGHAM *et al.*, 1995; UENO *et al.*, 2009). Desta forma, ao inibir a atividade do sistema complemento e reduzir a produção de citocinas pró-inflamatórias, a GP63 atua como um importante fator de virulência no desenvolvimento intracelular do parasito e no estabelecimento da infecção (MURASE *et al.*, 2018).

O LPG, por sua vez, é um glicolípido de organização complexa e, assim como a proteína GP63, contribui para a virulência de *Leishmania* ao impedir a formação do complexo de ataque a membrana (C5b-C9) e sua ligação à membrana do parasito (Figura 1). Também interage com a proteína C reativa, proteína de fase aguda da inflamação, que desencadeia a fagocitose e inibe a formação dos fagolisossomos, evitando as consequências microbidas do processo fagocitário (PUENTES *et al.*, 1990; TALAMAS-ROHANA *et al.*, 1990; LÁZARO-SOUZA *et al.*, 2018).

Em condições fisiológicas, promastigotas de *L. major*, *L. donovani*, *L. infantum* e *L. amazonensis* são destruídas pelo sistema complemento após 2,5 minutos no sangue humano. Estudos mostram que, após um minuto de contato de *L. amazonensis* e *L. donovani* com o sangue humano, foram encontrados granulócitos infectados. Portanto, para que o parasito escape do sistema complemento, é essencial que infecte uma célula fagocítica (DOMINGUEZ *et al.*, 2002; MORENO *et al.*, 2010).

Figura 1. Papel das moléculas de superfície gp63 e LPG na evasão da resposta imune causada por *Leishmania*.



FCγR: receptor da proteína C reativa. PCR: proteína C reativa. Fonte: a autora (2020).

2.2.1.2 Neutrófilos e a estratégia do “cavalo de Tróia”

Os neutrófilos são os leucócitos mais abundantes do sangue e, por isso, são as primeiras células a serem recrutadas para locais de lesão tecidual e infecções microbianas. Desempenham papel muito importante na imunidade inata e na regulação da imunidade adaptativa (NAUSEEF e BORREGAARD, 2014).

Estas células possuem estratégias para eliminar patógenos invasores, que incluem a fagocitose e subsequente destruição do microrganismo nos fagolisossomos, a liberação do seu conteúdo granular no microambiente local, e a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs). Além disso, liberam as armadilhas extracelulares dos neutrófilos (NETs, do inglês *neutrophil extracellular traps*), estruturas de DNA associadas a proteínas microbicidas, capazes de capturar microrganismos e até mesmo destruí-los (BRINKMANN *et al.*, 2004). Citocinas e quimiocinas liberadas por neutrófilos estão envolvidas na ativação e/ou recrutamento de outras células, contribuindo assim para a formação e desenvolvimento de uma resposta imune adaptativa (SCAPINI e CASSATELLA, 2014).

Embora os macrófagos sejam as células predominantemente infectadas na leishmaniose, não são as primeiras a serem recrutadas para o local da inoculação do parasito. Há evidências de que os neutrófilos são as primeiras células a chegarem no sítio de inoculação e, embora seu papel durante a infecção não seja consensual, há indícios de que *Leishmania* tem capacidade para modular sua vida útil (CECÍLIO *et al.*, 2014).

Os neutrófilos têm um período de vida curto, entre 6 a 10 horas e, após atingir esse tempo entram em apoptose, estando infectados ou não. No entanto, quando infectados, há um atraso no processo apoptótico favorável ao parasito, que se encontra em um nicho intracelular seguro (AGA *et al.*, 2002; GEERING e SIMON, 2011). O retardo da apoptose dos neutrófilos é uma estratégia óbvia do parasito para prolongar sua permanência nessas células e utilizá-las para sua replicação (REGLI *et al.*, 2017).

Depois de infectados, neutrófilos secretam diferentes fatores quimiotáticos para macrófagos. Quantidades elevadas de IL-10 e baixas quantidades de IL-12, produzidas por macrófagos, contribuem para a entrada silenciosa de *L. major* nos macrófagos (MENTEN *et al.*, 2002; VAN ZANDBERGEN *et al.*, 2004; FILARDY *et al.*, 2010). O parasito pode, portanto, chegar de forma despercebida à sua célula hospedeira primária e prosseguir com o

processo de infecção, usando a estratégia denominada “Cavalo de Tróia” (JOHN e HUNTER, 2008).

2.2.1.3 Sobrevivência no interior do macrófago

Para sobreviver dentro do macrófago, *Leishmania* deve resistir às condições adversas intracelulares, que incluem pH ácido, temperatura elevada e aumento do estresse oxidativo/nitrosativo (GUPTA *et al.*, 2013). Após a fagocitose, as formas promastigotas são internalizadas em compartimentos endossômicos, onde se transformam em amastigotas. A fim de escapar do ambiente hostil do fagolisossomo, as promastigotas impedem transitoriamente a fusão do fagossomo e do lisossomo, retardando ou inibindo a maturação endossômica (OLIVIER *et al.*, 2005; PODINOVSKAIA e DESCOTEAUX, 2015). O LPG presente na sua superfície inibe a maturação do endossomo, através do acúmulo de F-actina. Evita também a acidificação do fagossomo, ao interferir na bomba V-ATPase, o que permite a diferenciação de promastigotas em amastigotas resistentes (VINET *et al.*, 2009).

A eliminação de esfingolípídios no hospedeiro é outra estratégia de sobrevivência empregada pelas formas amastigotas para combater o ambiente ácido do fagolisossomo. Para diminuir o efeito leishmanicida do óxido nítrico, *Leishmania* regula a proteína do tráfego lisossômico (LYST), resultando na formação de vacúolos parasitóforos (WILSON *et al.*, 2008; ALI *et al.*, 2012).

Formas amastigotas requerem ferro para seu metabolismo e replicação, portanto a aquisição de ferro é fundamental para sua sobrevivência no fagolisossomo dos macrófagos (HUYNH e ANDREWS, 2008). O ferro medeia a geração de EROs, que normalmente são deletérios para patógenos, mas que podem também atuar como moléculas sinalizadoras, regulando a diferenciação do parasito (PODINOVSKAIA e DESCOTEAUX, 2015). Em macrófagos murinos, a proteína Nramp1 funciona como uma bomba de efluxo, que transloca ferro do fagolisossomo para o citoplasma, restringindo assim sua disponibilidade ao parasito. *Leishmania* neutraliza esse efeito pela ativação de seus próprios transportadores de ferro (*Leishmania iron transporters*), LIT1 e LIT2, que competem efetivamente com o mecanismo de sequestro de ferro do hospedeiro (KAYE e SCOTT, 2011).

O aminoácido arginina também é um fator de crescimento essencial exigido pelas amastigotas para a síntese de poliaminas, mas também é usada por macrófagos para a produção de óxido nítrico. Esses fatores de virulência expressos pelas amastigotas de

Leishmania permitem que o parasito iniba a resposta imune celular do hospedeiro e sobreviva no fagossomo (INIESTA *et al.*, 2001; KROPF *et al.*, 2003).

2.2.1.4 Alteração das vias dos receptores tipo *Toll*

Os receptores do tipo *Toll* (TLRs), expressos nas células do sistema imunológico inato, são essenciais para o reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), e a interação inicial do parasito com diferentes TLRs determina o resultado da infecção (FARIA *et al.*, 2012).

Nos macrófagos, TLR2 reconhece o LPG presente no glicocálice das formas promastigotas de *Leishmania* e antígenos específicos de amastigotas (SRIVASTAVA *et al.*, 2012). A interação LPG-TLR2 leva a produção de TNF- α , IL-12, óxido nítrico (NO) e EROs (FLANDIN *et al.*, 2006; KAVOOSI *et al.*, 2009; KAVOOSI *et al.*, 2010).

O uso de agonistas de TLR2 induz à resposta imune protetora no hospedeiro, que resulta na remoção do parasito de macrófagos infectados por *L. donovani* (BHATTACHARYA *et al.*, 2010). Para modificar essa resposta inflamatória, *L. major* recruta proteínas da família dos supressores da sinalização de citocinas, SOCS-1 e SOCS-3, que regulam negativamente a indução de citocinas induzida por TLR2 (DE VEER *et al.*, 2003). Outro mecanismo de supressão de TLR2 mediada por *Leishmania* envolve a ativação da enzima desubiquitinase A20 do hospedeiro por promastigotas de *L. donovani*, que compromete a liberação de IL-12 e TNF- α mediada por TLR2, uma vez que o parasito interfere na ubiquitinação de TRAF6 (SRIVASTAV *et al.*, 2012).

Por outro lado, *L. amazonensis* interfere na sinalização de TLR2 para facilitar o estabelecimento da infecção, ao aumentar a expressão da proteína quinase dependente de RNA (PKR) e IFN- β . O IFN- β eleva os níveis de superóxido dismutase 1, que inibe a morte do parasito dependente de superóxido e aumenta sua replicação (KHOURI *et al.*, 2009; VIVARINI *et al.*, 2011). Além disso, estudo semelhante com camundongos deficientes em TLR2 mostrou o papel essencial deste receptor no desenvolvimento da lesão durante a infecção por *L. braziliensis* (VARGAS-INCHAUSTEGUI *et al.*, 2009). Esses achados sugerem múltiplos mecanismos empregados por diferentes espécies de *Leishmania* para alterar a sinalização do TLR2 e permitir sua sobrevivência.

O receptor TLR4 desempenha papel crítico na formação da resposta imune do hospedeiro durante a infecção por *Leishmania*. Estudos em ratos com duplo knockout para TLR4 (-/-) demonstram a função de TLR4 no controle da infecção por *L. major* (KROPF *et al.*, 2004a; KROPF *et al.*, 2004b). O glicosfingofosfolípídeo (GSPL) e o complexo proteoglicolípídeo (P8GLC) de *Leishmania* ativam TLR4, promovendo uma forte resposta imune antiparasitária (WHITAKER *et al.*, 2008; KARMAKAR *et al.*, 2012).

Logo, o parasito desenvolveu estratégias para alterar as vias de sinalização de TLR4, para favorecer o estabelecimento de infecção. Durante a infecção por *L. donovani*, a ativação de macrófagos mediada por TLR4 é suprimida através da liberação de TGF- β (DAS *et al.*, 2012). *L. major* utiliza os inibidores da serina protease (ISP) para impedir a ativação do TLR4, inibindo a captação e a morte de *Leishmania* por macrófagos (RIBEIRO-GOMES *et al.*, 2007; FARIA *et al.*, 2011). Por outro lado, *L. mexicana* interfere na sinalização de TLR4 para inibir a produção de IL-12 por macrófagos infectados e promover o estabelecimento de parasitos (SHWEASH *et al.*, 2011).

Outros TLRs envolvidos na infecção por *Leishmania* incluem TLR3 e TLR9. O TLR3 endógeno se liga ao RNA de fita dupla e poder ser ativado durante a infecção por *Leishmania*. Foi demonstrado que cepas virulentas de *L. guyanensis* que abrigam o RNA vírus de *Leishmania* (LRV1) ativam a via dependente de TLR3-TRIF, essencial para o aumento da expressão de mediador pró-inflamatório após a infecção por macrófagos (HARTLEY *et al.*, 2012). Curiosamente, as respostas imunes mediadas por TLR3 tornaram os camundongos mais suscetíveis à infecção, mostrando edema nas patas e parasitemia, juntamente com aumento de metástases (IVES *et al.*, 2011).

2.2.2 Resposta do hospedeiro frente à infecção

Células T são consideradas as mais importantes do sistema imunológico, capazes de se diferenciar em vários subgrupos, como as células Th1, Th2, Th17, Treg, entre outras. Esses subgrupos são gerados a partir de um estímulo inicial, transmitido por diferentes células apresentadoras de antígenos (APCs), como macrófagos e células dendríticas. *Leishmania* reconhece as APCs e se multiplica no ambiente hostil dessas células (JAWED *et al.*, 2016; AZZOUZ e LAWTON, 2017). Durante a progressão da infecção, o parasito modula o macrófago hospedeiro ou a célula dendrítica para sua sobrevivência e, como

resultado, os fatores específicos secretados pela APC reprogramada ajudam na diferenciação de subconjuntos específicos de células T (JAWED *et al.*, 2019).

Os componentes do sistema imunológico desempenham papel vital para remoção do parasito por meio das APCs, produção de citocinas e quimiocinas e das células T (LUCKHEERAM *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2018). As células T são caracterizadas pela presença de marcadores específicos em sua superfície, tais como: CD3, CD4 e CD8; expressão de fatores de transcrição, como GATA-3, Tbet, ROR γ t e Foxp3; e interação com classes específicas do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) para reconhecimento de antígenos, como MHCI e MHCII (MINGARI e MORETTA, 1982; JOÃO *et al.*, 2006).

Algumas células T, como as células Th17, secretam as citocinas IL-17 e IL-6, que ajudam a atingir o estado pró-inflamatório e fornecem imunidade protetora contra infecções parasitárias (BRINKHOFF *et al.*, 2018). A ocorrência de tal diversidade nos subgrupos de células T nos ajuda a explorar seus aspectos funcionais e a categorizar o grupo específico de células sob o papel seletivo que elas desempenham. As células T reconhecem antígenos ligados ao MHC, auxiliam na proliferação de outras células T, na ativação de células B, na regulação da resposta imune intensa e na conexão do sistema imune inato e adaptativo, para indução de uma resposta da memória (RABB, 2002).

2.2.2.1 Células T CD4+

A maioria dos linfócitos T são células T CD4+. Possuem esse nome por expressarem em sua membrana a glicoproteína CD4, que reconhece antígenos ligados a molécula de MHC de classe II. Linfócitos T CD4+ funcionam principalmente como células T auxiliares. Ao interagirem com o complexo MHC II, as células T CD4+ “virgens” (*naive*) se diferenciam em Th1 ou Th2, dependendo do microambiente (LUCKHEERAM *et al.*, 2012).

No perfil Th1, são secretadas citocinas pró-inflamatórias, como IL-12, IFN- γ e TNF- α , associadas a uma resposta protetora do hospedeiro à *Leishmania*, enquanto no perfil Th2 são produzidas IL-4 (nos casos de leishmaniose cutânea), IL-10 e TGF- β (nos casos da doença visceral), relacionadas à suscetibilidade e progressão da doença. No entanto, essa polarização Th1/Th2 parece ser observada apenas em alguns modelos murinos e não pode ser totalmente aplicável à doença humana ou canina, que geralmente apresentam uma

resposta mista de citocinas, variável e dependente da espécie infectante (CECÍLIO *et al.*, 2014; JAWED *et al.*, 2018).

2.2.2.2 Células T CD8+

Células T CD8+ são linfócitos T citotóxicos, que expressam a glicoproteína dimérica CD8 em sua membrana e reconhecem antígenos ligados ao complexo MHC classe I. Quando as células T CD8+ *naive* são ativadas, podem acontecer três mecanismos de defesa contra a infecção. O primeiro é a produção de citocinas IFN- γ e TNF- α , o segundo é a liberação de grânulos citotóxicos, como perforina e granzima, e o terceiro é a destruição das células infectadas por meio das interações Fas/FasL (WHERRY *et al.*, 2003). No caso de LV causada por *L. donovani*, foi relatado que a presença de células T CD8+ confere proteção contra o início e a progressão da doença através da secreção de perforina e granzima (KAUSHAL *et al.*, 2014).

2.2.2.3 Células Th17

Células Th17 também fazem parte da linhagem de células T CD4+, caracterizadas pela produção das citocinas IL-17, IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22, TNF- α , IL-6 e IL-26 (HARRINGTON *et al.*, 2005; CROME *et al.*, 2010). As células Th17 são altamente responsivas a determinadas quimiocinas e receptores de citocinas, como CCR4, CCR6 e IL-23R, expressos na sua superfície celular (SATO *et al.*, 2007). As citocinas produzidas têm efeitos patogênicos e benéficos. Ajudam na eliminação de microrganismos patogênicos, mas, por outro lado, a liberação contínua de IL-17 leva a doenças autoimunes por inflamação crônica (OUYANG *et al.*, 2008). Na LV, as células Th17 estão associadas à resposta imune protetora do hospedeiro, através da secreção de IL-17 e do recrutamento de neutrófilos para o local de inoculação (GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE *et al.*, 2017).

2.2.2.4 Células T regulatórias

As células T regulatórias (Treg) são um subconjunto de células T CD4+ que expressam constitutivamente CD25 (ALLOS *et al.*, 2019). São amplamente estudadas em modelos humanos e experimentais de LV, onde foi evidenciado que estão associadas a maior suscetibilidade à infecção, devido a secreções elevadas de IL-10 e TGF- β (RAI *et al.*, 2012). Tal estímulo leva à produção de IL-10 por células Th2, o que confere maior supressão imunológica ao hospedeiro infectado (LEVEQUE *et al.*, 2009).

2.2.2.5 Células T Natural Killer (T NK)

É um subgrupo incomum do sistema imunológico, que não exibem as moléculas de membrana e os receptores típicos de células T, que distinguem suas diferentes linhagens. Geralmente são caracterizados pela presença de marcadores como NK 1.1, NK 1.2, CD16 e CD56. Atuam na ausência de anticorpos ou de MHC, exercem função de linfócitos citotóxicos e produzem quantidade abundante de citocinas ao encontrar um antígeno (WU e VAN KAER, 2009). Funcionam como uma ponte entre o sistema imune inato e adaptativo produzindo rapidamente uma grande variedade de citocinas exclusivas (ROBERTSON *et al.*, 2014). Após a ativação, as células T NK secretam IFN- γ , TNF- α , IL-23 e citocinas Th17, que restauram a resposta imune do hospedeiro e ajudam na eliminação efetiva do parasito (JAWED *et al.*, 2019).

2.3 Manifestações clínicas da LVC

Os aspectos clínicos e laboratoriais da LVC são bastante variáveis em decorrência da resposta imune orquestrada pelo organismo frente à infecção. Por ser uma doença sistêmica, pode envolver potencialmente qualquer órgão, tecido e fluido biológico (BANETH *et al.*, 2008; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009; PALTRINIERI *et al.*, 2010).

Os sinais clínicos mais relatados pela literatura são dermatopatias (alopecia, dermatite esfoliativa, hiperqueratose, úlceras cutâneas, onicogribose), alterações oftálmicas (conjuntivite, ceratoconjuntivite, blefarite, uveíte), linfadenopatia generalizada, perda progressiva de peso, anorexia, apatia, atrofia muscular, poliúria, polidipsia, febre, esplenomegalia, hepatomegalia e alterações renais. Outras manifestações clínicas mais incomuns incluem ascite, síndrome nefrótica, epistaxe, poliartrite, sinais neurológicos e cardiorrespiratórios (KOUTINAS *et al.*, 1999; BLAVIER *et al.*, 2001; BANETH *et al.*, 2008; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009; MELÉNDEZ-LAZO *et al.*, 2018). Como os sinais são variáveis e inespecíficos, é vasta a relação de diagnósticos diferenciais para LVC (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009).

Os achados de patologia clínica de rotina reforçam ainda mais a suspeita clínica e, em alguns casos, podem ser a única indicação da doença. Os mais frequentes incluem anemia normocrômica, normocítica e não regenerativa, aumento da proteína total e globulina (principalmente beta e gamaglobulina), hipoalbuminemia, diminuição da razão albumina/globulina, aumento da atividade das enzimas hepáticas e proteinúria glomerular

(CIARAMELLA *et al.*, 1997; KOUTINAS *et al.*, 1999; SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2001; CORONA *et al.*, 2004; CORTADELLAS *et al.*, 2006; PLEVRAKI *et al.*, 2006; SHAW *et al.*, 2009). Além da mensuração quantitativa da proteinúria (razão proteína/creatinina na urina), é imprescindível a avaliação da função renal através das concentrações de nitrogênio da ureia no sangue, creatinina e fósforo inorgânico, uma vez que, quando presente, a azotemia renal tem grande impacto nas decisões terapêuticas e no prognóstico do animal (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009).

A classificação clínica clássica dos animais em assintomáticos, oligossintomáticos e sintomáticos se baseia apenas no exame físico e, por esse motivo, é bastante limitada (SOLANO-GALLEGO e BANETH, 2008; MOMO *et al.*, 2014). Logo, buscou-se estabelecer uma classificação mais apropriada, já que existe uma diversidade de sinais clínicos, com diferentes graus de gravidade e prognósticos. O estadiamento clínico é de grande importância em cães com leishmaniose, não apenas do ponto de vista clínico, para avaliação da gravidade e prognóstico, mas também para fins de pesquisa clínica (MELÉNDEZ-LAZO *et al.*, 2018).

Várias tentativas foram realizadas para estabelecer a classificação clínica mais adequada, sendo as propostas pelo LeishVet e pelo *Canine Leishmaniasis Working Group* (CLWG) as mais utilizadas, com boa concordância entre ambas (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009; PALTRINIERI *et al.*, 2010).

No sistema LeishVet, a doença é classificada em quatro estágios de evolução: estágio I (doença leve), estágio II (doença moderada), estágio III (doença grave) e estágio IV (doença muito grave), com base no exame físico, sorologia e parâmetros hematológicos e bioquímicos, além de avaliação detalhada da função renal, em conformidade com a *International Renal Interest Society* (IRIS) (SOLANO-GALLEGO *et al.*, 2009). Já o sistema do CLWG classifica os cães em quatro estágios: estágio A (cães expostos), estágio B (cães infectados), estágio C (cães doentes) e estágio D (cães gravemente doentes), de acordo com a condição clínica, associada ao diagnóstico sorológico e parasitológico (citologia, histologia ou PCR) e anormalidades clínico-patológicas. Vale ressaltar que os sistemas de classificação não devem ser considerados como um esboço rígido e esquemático de uma doença tão complexa, mas como ferramentas úteis para o manejo de cães afetados (PALTRINIERI *et al.*, 2010).

Não existe consenso sobre a relevância de cada fase da doença ou de cada forma clínica na transmissão do parasito. Alguns trabalhos mostram que a maior parte da transmissão aos vetores resulta de uma pequena proporção de animais com alta carga parasitária, o que estaria relacionado a manifestações clínicas graves (COURTENAY *et al.*, 2002; COURTENAY *et al.*, 2014). Por outro lado, animais assintomáticos também podem ser altamente infecciosos, indicando seu papel na manutenção e disseminação do protozoário em áreas endêmicas (LAURENTI *et al.*, 2013). Embora os resultados sejam divergentes, é prudente considerar igualmente cães sintomáticos e assintomáticos na recomendação de medidas de controle da doença (RIBEIRO *et al.*, 2018).

2.4 Tratamento da LVC

Ao contrário dos países europeus, nos quais o tratamento da LVC é rotineiro e há disponibilidade de várias drogas, como os antomoniatos pentavalentes, anfotericina B, miltefosina, alopurinol, domperidona, paramomicina e pentamidina, no Brasil o tratamento foi vetado até o ano de 2016 (MIRÓ *et al.*, 2009; OLIVA *et al.*, 2014; MATTIN *et al.*, 2014; REGUERA *et al.*, 2016).

Em 2008 foi estabelecida a Portaria Interministerial nº 1.426, entre o MS e o MAPA, que proibiu a intervenção terapêutica em animais com drogas destinadas ao uso humano ou não registradas no MAPA. Os argumentos para tal decisão foram que nenhum fármaco ou esquema terapêutico garantiria a eficácia do tratamento e a não-infectividade dos cães, a falta de evidências científicas da interrupção da transmissão do parasito, além do risco de indução e seleção de cepas resistentes aos medicamentos. Desta forma, o médico veterinário que descumprisse as determinações da Portaria estaria sujeito às penalidades do Código de Ética Profissional e do Código Penal (BRASIL, 2008b).

Para obtenção do registro, era necessário que a parte interessada, além de observar os previstos na legislação vigente, realizasse ensaios clínicos controlados e emitisse relatório de conclusão dos mesmos, mediante nota técnica conjunta (BRASIL, 2008b). Desta maneira, em 2016, por meio da Nota Técnica nº 001/2016, foi autorizado o registro do fármaco Milteforan™ (miltefosina), do Laboratório Virbac Saúde Animal e, com isso, o tratamento da LVC no Brasil passou a ter um caráter legal (BRASIL, 2016).

Do ponto de vista químico, a miltefosina (hexadecilfosfocolina) é um alquilfosfolípídio, muito semelhante às lecitinas (REGUERA *et al.*, 2016). Originalmente,

foi desenvolvida como droga antitumoral para o tratamento tópico de metástases cutâneas de carcinomas mamários (HILGARD *et al.*, 1993; LEONARD *et al.*, 2001) mas, simultaneamente, seu potencial leishmanicida foi identificado (BERMAN, 2005). Foi o primeiro e permanece sendo o único medicamento oral utilizado no tratamento da leishmaniose (SUNDAR *et al.*, 2013), sendo eficaz para casos humanos e caninos (SUNDAR *et al.*, 1998; JHA *et al.*, 1999; SUNDAR *et al.*, 1999; VERMA E DEY 2004; MATEO *et al.*, 2009; MIRÓ *et al.*, 2009; WOERLY *et al.*, 2009).

O mecanismo de ação da miltefosina ainda não está claramente definido, mas acredita-se que seu princípio ativo atue em mais de um alvo molecular (WOERLY *et al.*, 2009). Estudos *in vitro* mostram que a droga inibe a biossíntese do receptor glicosilfosfatidilinositol (GPI), a principal molécula para a sobrevivência intracelular do protozoário; de fosfolipases e proteínas quinases C específicas de *Leishmania* (SANTOS NOGUEIRA *et al.*, 2019). Como a síntese de glicolípídios e glicoproteínas da membrana do parasito é alterada, ocorre morte celular por apoptose e disfunção mitocondrial (VERMA e DEY, 2004; LUQUE-ORTEGA E RIVAS, 2007). Além disso, a miltefosina promove resposta Th1 dependente de IL-12 em cães, que resulta no aumento dos níveis séricos de IFN- γ e na produção de NO e EROs por macrófagos, o que demonstra suas propriedades imunomoduladoras (MANNA *et al.*, 2008; ANDRADE *et al.*, 2011; BALAÑA-FOUCE *et al.*, 2012).

Quimicamente, a molécula da miltefosina possui natureza zwitteriônica, ou seja, é eletricamente neutra, mas possui cargas opostas em diferentes átomos. O grupamento amina quaternária é carregado positivamente e o grupo fosforil, negativamente, o que a torna mais solúvel em água. Em termos práticos, isto representa uma grande vantagem sobre a maioria das drogas leishmanicidas, pois permite sua administração por via oral (REGUERA *et al.*, 2016).

A dose recomendada quando utilizada como monoterapia para LVC é de 2 mg/kg/dia, durante 28 dias (NOLI e SARIDOMICHELAKIS, 2014). Os parâmetros farmacocinéticos da miltefosina têm interferência direta na prática clínica em cães. É uma droga de absorção lenta e biodisponibilidade estimada em 94%, com meia-vida de aproximadamente 159 horas. Por apresentar baixa depuração plasmática, a taxa de acúmulo no sangue é 5-6 vezes maior após repetidas administrações. A miltefosina não é substrato de enzimas do metabolismo oxidativo, mas pode ser clivada em colina nos hepatócitos através das fosfolipases C e D, e

seus produtos de degradação utilizados para a síntese de acetilcolina ou lecitina no hospedeiro (DORLO *et al.*, 2012).

Ensaio clínico demonstram que o fármaco apresenta bons resultados para LVC e contribui para a melhoria dos sinais clínicos até dois anos após o tratamento (WOERLY *et al.*, 2009; ANDRADE *et al.*, 2011). No entanto, apesar da redução da carga parasitária na maioria dos órgãos, a eliminação parasitário na medula óssea não é alcançado, logo, os animais permanecem parasitologicamente positivos (MATEO *et al.*, 2009). Portanto, a terapia combinada com outras drogas leishmanicidas ou leishmanioestáticas é desejada na prática veterinária.

Pela ausência de efeitos nefrotóxicos, a miltefosina pode ser utilizada em pacientes com comprometimento renal e recidivantes (BIANCIARDI *et al.*, 2009; MANNA *et al.*, 2015). Entretanto, não se recomenda a administração em fêmeas prenhes, pois possui propriedades teratogênicas já relatadas em roedores e seres humanos (SINDERMANN e ENGEL, 2006). Embora não haja dados sobre a toxicidade reprodutiva em cadelas, seu uso deve ser evitado em casos de prenhez. Reações adversas ao medicamento já foram descritas em cães, especialmente desordens gastrointestinais (vômito, diarreia, dor intestinal), anorexia, diminuição do hematócrito e da série branca do sangue (MANNA *et al.*, 2009; MATEO *et al.*, 2009; WOERLY *et al.*, 2009).

Além dos efeitos adversos, uma das maiores preocupações em torno do tratamento é o surgimento de cepas resistentes de *L. infantum*, uma vez que já foram relatados casos em humanos (MONDELAERS *et al.*, 2016). Um dos fatores que pode contribuir para a seleção de cepas resistentes no hospedeiro é a meia-vida prolongada da droga, associado ao seu uso indevido, seja por meio da administração de doses sub-ótimas ou pela duração insuficiente da terapia (MANNA *et al.*, 2009). Os possíveis mecanismos envolvidos na resistência incluem a captação reduzida da droga, permeabilidade diferencial da membrana plasmática e aumento do efluxo por transportadores específicos de MDR-1 (*multi-drug resistance protein 1*), uma proteína associada à resistência a múltiplas drogas (OUELLETTE *et al.*, 2004; PÉREZ-VICTORIA *et al.*, 2006).

Embora raramente se alcance a cura parasitológica dos animais, aliada à possibilidade de recorrências clínicas após o tratamento, é válido ressaltar que o protocolo terapêutico pode promover a cura clínica, aumentar a expectativa e a qualidade de vida do

animal, bem como reduzir a carga parasitária. É importante frisar também que a decisão de tratar um cão doente deve ser consensual, entre o médico veterinário, que deve avaliar a evolução clínica do animal através de exames físicos e laboratoriais (perfil hematológico, bioquímico, sorológico e urinálise), e o tutor, que deve cumprir o protocolo determinado. Por razões de saúde pública e para impedir a reinfeção, é necessário também o uso contínuo de coleiras inseticidas à base de flumetrina ou deltametrina, bem como monitoramento veterinário constante (GHARBI *et al.*, 2015; RIBEIRO *et al.*, 2018).

2.5 Tratamentos alternativos: o uso de plantas medicinais

Apesar da disponibilidade da miltefosina para o tratamento da LVC no Brasil, esta permanece como a única droga liberada para fins terapêuticos em cães, o que traz à tona alguns entraves. Um deles refere-se ao alto custo do produto. O preço médio da medicação, dependendo da quantidade (frascos de 30 mL, 60 mL ou 90 mL), pode chegar até R\$ 2.000,00, valor acima da média para boa parte das famílias brasileiras. Por esse motivo, acaba não sendo acessível a toda população, com conseqüente diminuição à adesão ao tratamento (MIDIAMAX, 2018).

Somado a isso, caso o animal não tenha uma resposta clínica satisfatória, não há outras opções quimioterápicas disponíveis. Por fim, como já discutido anteriormente, o surgimento de parasitos resistentes é um risco potencial (MANNA *et al.*, 2009). Desta forma, o desenvolvimento de novas drogas, com menos efeitos adversos, mais eficazes e com melhor custo-benefício, bem como de estratégias terapêuticas alternativas mais acessíveis, tornou-se uma necessidade (LAGE *et al.*, 2013).

A formulação de novos fármacos segue três vertentes: a exploração das vias metabólicas do parasito, para fins de produção de drogas sintéticas que atuem em alvos específicos; o reposicionamento de produtos já existentes no mercado, mas utilizados para outros propósitos terapêuticos (a exemplo da miltefosina e da anfotericina B) e a utilização de plantas como fonte de compostos bioativos (LINDOSO *et al.*, 2012).

De acordo com a Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA), plantas medicinais são aquelas utilizadas tradicionalmente pela população, com propósitos terapêuticos e/ou profiláticos (ANVISA, 2019). Ao longo da história, têm sido utilizadas como fontes de novos compostos, servindo como substrato para muitos produtos da rotina médica (CRAGG *et al.*, 2009). O uso de plantas medicinais tornou-se uma alternativa aos

serviços tradicionais de saúde, especialmente nos países em desenvolvimento, tanto em condições de escassez de recursos públicos ou como opção ou complemento aos medicamentos alopáticos (FORMAGIO *et al.*, 2013).

O Brasil é um país extremamente rico em termos de biodiversidade de flora, com potencial para a exploração racional dos recursos vegetais e difusão das práticas fitoterápicas (MYERS *et al.* 2000). Tais práticas geram benefícios do ponto de vista cultural, através da disseminação do conhecimento empírico, bem como do ponto de vista científico, por meio da validação das propriedades biológicas das espécies vegetais (KÜLKAMP *et al.*, 2007; MENEZES *et al.*, 2012).

O interesse da comunidade científica mundial nesse campo é crescente, ao reconhecer o verdadeiro benefício à saúde que as plantas fornecem (MIGUEL e MIGUEL, 2004). Uma solução para o combate a numerosas doenças, sobretudo aquelas de caráter negligenciado, consiste no conhecimento tradicional e no desenvolvimento de novos medicamentos derivados de produtos da biodiversidade (WHO, 2013).

Extratos brutos e óleos essenciais possuem em sua composição constituintes químicos com um rol de atividades biológicas, dentre elas, potencial capacidade anti-*Leishmania*, que pode ser atribuída à presença de metabólitos secundários, como alcaloides, compostos fenólicos e terpenos (DA SILVA *et al.*, 2018a). Tal efeito pode se dar de forma direta sobre o parasito ou de maneira indireta, através da modulação da resposta imune do hospedeiro (CALLA-MAGARINOS *et al.*, 2009). Deste modo, a busca por extratos e óleos com amplo espectro de atividade leishmanicida e imunomodulatória pode permitir a descoberta de substâncias adequadas para o tratamento da LV (RODRIGUES *et al.*, 2015).

2.6 Óleos essenciais

Óleos essenciais (OEs) são produtos do metabolismo secundário de plantas. São substâncias de natureza complexa, caracterizados por odor forte. Apresentam-se na forma de líquidos voláteis, de coloração translúcida à amarelada, miscíveis em solventes orgânicos e lipídeos e com densidade menor que a da água. Podem ser produzidos por todas as partes da planta: botões germinativos, flores, folhas, frutos, sementes, caule, raiz, galhos e cascas; sendo armazenados em células secretórias, cavidades, canais, células epidérmicas e tricomas glandulares (BAKKALI *et al.*, 2008).

Várias metodologias já foram desenvolvidas para a extração de OEs, dentre as quais hidrodestilação, destilação por arraste de vapor, uso de dióxido de carbono supercrítico, micro-ondas, ultrassom e solventes lipofílicos (WASEEM e LOW, 2015). O perfil químico dos óleos, bem como o tipo estereoquímico das moléculas extraídas, pode diferir de acordo com o método de extração escolhido. Por isso, é importante que esta seja determinada de acordo com o propósito de uso. Por exemplo, na indústria farmacêutica e de alimentos prefere-se a extração por destilação a vapor, para melhor preservação das propriedades antimicrobianas. Já para usos em perfumaria e na indústria cosmética de modo geral, o uso de solventes lipofílicos é favorecido (BAKKALI *et al.*, 2008; WIŃSKA *et al.*, 2019).

Fatores de ordem genética e ambiental podem interferir na composição química, na quantidade e qualidade do OE. Diferentes quimiotipos de plantas do mesmo gênero geralmente possuem compostos distintos, logo, a atividade biológica e suas aplicações também podem ser diferentes (DUNNING, 2013; CRAFT *et al.*, 2017; RETNOSARI *et al.*, 2018).

O meio ambiente possui uma importante interface com a produção de metabólitos secundários, por isso sua síntese é frequentemente afetada pelas condições ambientais. Sazonalidade, ritmo circadiano, idade e desenvolvimento da planta, temperatura, disponibilidade hídrica, radiação ultravioleta, nutrição, altitude, poluição atmosférica, estímulos mecânicos e ataque de patógenos podem, em maior ou menor grau, coordenar ou alterar a taxa de produção de metabólitos pelas plantas. Além disso, as etapas pós-coleta também podem influenciar na constituição do óleo, como a forma de extração, já mencionada anteriormente, a duração do processo e o armazenamento do produto (GOBBO-NETO e LOPES, 2007; MORAIS, 2009).

Para obtenção de um óleo padronizado, de composição constante, todo processo deve ser realizado sob as mesmas condições, desde a coleta até a extração. A mesma parte da planta deve ser coletada, sempre no mesmo horário, local e período do ano; cultivada nas mesmas condições de solo e clima (BAKKALI *et al.*, 2008). A uniformização da produção é importante, pois permite a melhor qualidade do produto e o mínimo de perdas (FIGUEIREDO *et al.*, 2009).

2.6.1 Composição química

OEs são misturas complexas, que apresentam em torno de 20 a 60 compostos químicos em sua composição, em concentrações variáveis. De modo geral, possuem dois a três constituintes presentes em maior quantidade quando comparados aos demais, denominados compostos majoritários. Em sua grande maioria, os compostos majoritários podem ser os responsáveis pela atividade biológica dos óleos, mas também podem atuar de maneira sinérgica com as demais substâncias presentes (IPEK *et al.*, 2005; BAKKALI *et al.*, 2008).

Os componentes químicos dos OEs podem ser divididos em dois grupos, o primeiro formado por terpenos e terpenoides e o segundo, por compostos aromáticos e alifáticos, todos caracterizados por baixo peso molecular (PICHERSKY *et al.*, 2006).

2.6.1.1 Terpenos e terpenoides

Os terpenos correspondem a um extenso grupo de substâncias químicas, que formam uma variedade de classes estruturalmente e funcionalmente distintas. Apesar disso, todos são compostos pela mesma unidade básica de formação, o isopreno (C₅), blocos de cinco carbonos cada, ligados entre si pela ordem “cabeça-cauda” (ESCHENMOSER e ARIGONI, 2005). Quando contém uma molécula de oxigênio em sua composição, o terpeno é denominado terpenoide, que pode se apresentar na forma de diferentes funções químicas, como álcoois, cetonas, éteres, ésteres, fenóis, entre outras (FELIPE e BICAS, 2017).

A biossíntese dos terpenos pode ocorrer através de duas rotas metabólicas distintas, a via do ácido mevalônico (MVA) ou mevalonato, que acontece no citoplasma, e a via do metileritritol fosfato (MEP), que ocorre nos plastídeos (RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN e BORONAT, 2002).

Na primeira rota, a acetil coenzima A (acetil-CoA) é convertida em MVA que, por sua vez, sofre sucessivos processos de fosforilação e descarboxilação, que culminam na formação do isopentenil pirofosfato (IPP) e seu isômero dimetilalil pirofosfato (DMAPP), isoprenos precursores de todos os terpenos. Na segunda rota biossintética, ocorre a condensação da hidroxietil tiamina, derivada do piruvato, e do grupamento aldeído C1 do gliceraldeído 3-fosfato (GA-3P), com formação de 1-desoxilulose 5-fosfato (DXP). A

molécula de DXP é reduzida a MEP que, por sua vez, passa por consecutivas reações de redução e fosforilação até formar uma mistura de IPP e DMAPP (VRANOVÁ *et al.*, 2013).

Os terpenos são classificados de acordo com a quantidade de resíduos de isopreno presentes em sua estrutura: hemiterpenos (C5), monoterpenos (C10), sesquiterpenos (C15), diterpenos (C20), triterpenos (C30), tetraterpenos (C40) e politerpenos (>C40), sendo os monoterpenos e sesquiterpenos os principais constituintes dos OEs (DEWICK, 2002).

Monoterpenos são formados pela união de duas unidades de isopreno, bastante abundantes em plantas aromáticas. Podem ser subdivididos de acordo com seu grau de ciclização em acíclicos, monocíclicos e bicíclicos, o que contribui para formação de uma diversidade de estruturas químicas (VAN DER WERF, 2000; DEWICK, 1997). Sesquiterpenos, por sua vez, são compostos por três unidades de isopreno e, com o aumento da extensão da sua cadeia, aumenta também o número de ciclizações, podendo ser encontrados na forma linear, monocíclica, bicíclica, tricíclica e na forma de lactonas (PERVEEN, 2018).

Por possuírem estruturas de menor peso molecular, monoterpenos e sesquiterpenos acabam sendo mais voláteis, o que contribui para o aroma dos óleos e produtos naturais. Já as moléculas maiores, como os tetraterpenos, colaboram de maneira indireta, através do seu catabolismo em norisoprenoides (MENDES-PINTO, 2009).

2.6.1.2 Compostos aromáticos e alifáticos

Os compostos aromáticos e alifáticos presentes nos óleos essenciais são derivados dos fenilpropanoides, uma grande classe de metabólitos secundários sintetizados a partir dos aminoácidos fenilalanina ou tirosina. Consistem na junção de um grupamento fenila aromático e uma cadeia lateral de propano de três carbonos (DENG e LU, 2017).

A via dos fenilpropanoides inicia-se com a fenilalanina, produzida a partir da via do chiquimato, embora a tirosina tenha sido proposta como ponto de partida em algumas espécies de monocotiledôneas (NOEL *et al.*, 2005; VOGT, 2010; LIU *et al.*, 2015). A fenilalanina passa pelo processo de desaminação, desencadeado pela enzima fenilalanina amônia liase (PAL) e produz ácido cinâmico, que é hidroxilado e transformado em ácido p-cumárico (BARROS *et al.*, 2016). Em seguida, o ácido p-cumárico é convertido em p-coumaroil-CoA, um importante ponto de ramificação que gera vários compostos

fenilpropanoides, como flavonoides, monolignóis, ácidos fenólicos, cumarinas e estilbenos (VOGT, 2010; LIU *et al.*, 2015).

2.7 Óleos essenciais e leishmaniose

Os compostos químicos presentes nos OEs possuem um amplo espectro farmacológico, com reconhecida ação analgésica, antioxidante, antimicrobiana, entre outras (SINGH *et al.*, 2007; VICTORIA *et al.*, 2012; ANDRADE *et al.*, 2016). Trabalhos evidenciam que vários óleos ou seus constituintes têm atividade inibitória em protozoários, especialmente do gênero *Leishmania* (UEDA-NAKAMURA *et al.*, 2006; SANTOS *et al.*, 2008; MEDEIROS *et al.*, 2011).

Como extensamente revisado por Luna *et al.* (2019), entre os anos 2000 e 2018 foram testados OEs de 142 plantas e 44 compostos isolados, em diversas espécies e formas evolutivas de *Leishmania* (*L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. aethiopica*, *L. donovani*, *L. chagasi*, *L. infantum*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. mexicana*, *L. tropica* e *L. major*). Destes, 51 OEs e 13 isolados exibiram valores de IC₅₀ (concentração inibitória do crescimento de 50% dos parasitos) iguais ou menores que 10 µg/mL, sendo considerados ativos.

Dentre os estudos citados, destacou-se a atividade leishmanicida do óleo de *Croton cajucara*, rico em linalol, e do composto isolado purificado, em concentrações nanomolares (ROSA *et al.*, 2003). Outro composto isolado, α -bisabolol, principal constituinte do óleo de *Vanillosmopsis arborea*, inibiu de forma eficaz o crescimento de formas promastigotas e amastigotas de *L. amazonensis*, e a baixa citotoxicidade e alto índice de seletividade suportam seu uso terapêutico para leishmaniose (COLARES *et al.*, 2013).

Óleos vegetais são ricas fontes de novas moléculas com potencial anti-*Leishmania*, a maioria deles comercialmente indisponível e estruturalmente difícil de sintetizar, mas seu mecanismo de ação ainda permanece pouco claro (EDRIS, 2007). Acredita-se que, por possuírem baixa densidade, difundem-se com maior facilidade pela membrana plasmática, o que melhora a interação com alvos intracelulares, como observado em parasitos do gênero *Plasmodium* (BOYOM *et al.*, 2003).

Os OEs, em seu estado puro, devem ser a primeira escolha para o início de testes biológicos e, conforme os resultados, avaliam-se os compostos isolados, *in vitro* e *in vivo*.

Estas etapas devem ser seguidas por dois motivos principais: o alto custo para purificação das substâncias isoladas e a incerteza se a atividade biológica do óleo é decorrente do sinergismo entre suas moléculas ou não (DA SILVA *et al.*, 2018a).

Vários compostos químicos presentes em OEs apresentam alta seletividade para *Leishmania* e induzem a morte do parasito em doses baixas, sem citotoxicidade para as células hospedeiras. Embora os resultados encontrados gerem forte interesse na busca pelo desenvolvimento de novas drogas, a maioria dos estudos foram realizados no modelo *in vitro*, por isso, são necessários modelos experimentais *in vivo*, bem como ensaios pré-clínicos, para caracterizar e validar o real potencial destas substâncias (LUNA *et al.*, 2019).

2.8 O gênero *Vernonia*

O gênero *Vernonia* pertence à família Asteraceae, também conhecida como Compositae, e à tribo Vernoniae. Numericamente, é um dos maiores gêneros da família, com aproximadamente 1000 espécies (FISEHA *et al.*, 2010). Seu nome foi dado em homenagem à William Vernon, botânico inglês responsável por sua coleta e identificação, no final dos anos 1600 (QUATTROCCHI, 1999).

As espécies de *Vernonia* encontram-se distribuídas no Velho e no Novo Mundo, sobretudo nas regiões tropicais. Desenvolvem-se nos mais diversos habitats, em termos ecológicos e climáticos, incluindo florestas tropicais, pântanos e áreas úmidas, planícies secas, savanas tropicais, locais desérticos até regiões mais frias (KEELEY e JONES, 1979). Morfológicamente, o gênero é composto por ervas daninhas, arbustos, lianas e árvores, anuais e perenes (DEMATTEIS E FERNANDEZ, 1998). Do ponto de vista sistemático, é um dos mais complexos da família Asteraceae, pois seus espécimes apresentam variabilidade morfológica muito baixa, o que dificulta a classificação taxonômica (KEELEY *et al.*, 2007).

O uso tradicional de *Vernonia* é bastante disseminado, principalmente no continente africano, mas é no Brasil que o maior número de espécies é encontrado (HATTORI e NAKAJIMA, 2008). Na medicina popular brasileira são conhecidas como "assa-peixe", "assa-peixe preto", "assa-peixe roxo", "pau de múquem" e "manjerição de cavalo" (FILIZOLA *et al.*, 2003) e são amplamente utilizadas em quadros de resfriados, bronquites, hemorragias, reumatismo e infecções uterinas (CORRÊA *et al.*, 2004). Nos países africanos, essas espécies são usadas no tratamento de amebíase, malária e doenças sexualmente

transmissíveis, além de serem úteis no combate ao estresse e como estimulante e afrodisíaco (KAMBIZI e AFOLAYAN, 2001; TONA *et al.*, 2004).

Algumas atividades biológicas do gênero *Vernonia* já foram comprovadas cientificamente, como por exemplo, o efeito antioxidante (OMOJOKUN *et al.*, 2019), anti-inflamatório (ADEPAPPO *et al.*, 2014), antimicrobiano (UNUOFIN *et al.*, 2018), antitumoral (HOWARD *et al.*, 2016), antimalárico (OMOREGIE e PAL, 2016), imunomodulador (EZEONU *et al.*, 2016), entre outros. Na Tabela 1, foram listados estudos realizados nos últimos seis anos, que avaliaram a ação biológica de extratos, frações, óleos essenciais e compostos isolados de *Vernonia*.

A pesquisa foi realizada na base de dados Pubmed, utilizando o descritor “*Vernonia*”. Em virtude da grande quantidade de artigos encontrados, os resultados foram filtrados com base no ano de publicação (de 2014 a 2020), sendo selecionados textos completos, que abordassem alguma atividade biológica de espécies do gênero.

Tabela 1. Atividades biológicas de espécies de *Vernonia* descritas na literatura (2014-2020)

Espécie	Atividade biológica	Extrato, frações ou compostos	Parte da planta	Modelo de estudo	Referência
<i>V. adoensis</i>	Anti-plasmódica	Extrato aquoso, metanólico e clorofórmico	Folhas	<i>In vivo</i>	ZEMICHEAL e MEKONNEN (2018)
<i>V. amygdalina</i>	Anti-inflamatória Antioxidante Antinociceptiva	Extrato acetônico	Folhas	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	ADEPAPO <i>et al.</i> (2014)
	Anti-inflamatória Antinociceptiva	Extrato metanólico	Folhas	<i>In vivo</i>	ONASANWO <i>et al.</i> (2017)
	Anti-inflamatória	Extrato etanólico	Folhas	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	ASANTE <i>et al.</i> (2019)
	Anti-inflamatória (modelo osteoartrite)	Extrato hidroetanólico	Folhas	<i>In vivo</i> <i>Ex vivo</i>	MADZUKI <i>et al.</i> (2019)
	Anti-inflamatória Antioxidante Protetor de DNA	Extrato aquoso e alcóolico	Folhas	<i>In vitro</i>	WANG <i>et al.</i> (2020)
	Anti-inflamatória Antinociceptiva Antipirética	Extrato etanólico	Folhas	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	ASANTE <i>et al.</i> (2019)
	Antioxidante Antibacteriana	Extrato hexânico, clorofórmico e acetônico	Flores	<i>In vitro</i>	HABTAMU e MELAKU (2018)
Antioxidante Neuroprotetora	Extrato aquoso	Folhas	<i>In vivo</i>	ERUKAINURE <i>et al.</i> (2019)	

Antioxidante	Alcaloides extraídos do extrato hexânico	Folhas	<i>In vivo</i>	OMOJOKUN <i>et al.</i> (2019)
Antioxidante (na disfunção erétil)	Fração rica em alcaloides	Folhas	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	OMOJOKUN <i>et al.</i> (2019)
Antiobesidade	Extrato aquoso e metanólico	Folhas	<i>In vivo</i>	EGEDIGWE <i>et al.</i> (2016)
Antiobesidade	Extrato seco	Folhas	<i>In vivo</i>	EKELEME-EGEDIGWE <i>et al.</i> (2017)
Antitumoral (linhagens H ^{RAS} e MDA-MB-468)	Extrato aquoso	Folhas	<i>In vitro</i>	HOWARD <i>et al.</i> (2016)
Antitumoral (linhagem PC-3)	Extrato metanólico	Folhas	<i>In vitro</i>	JOHNSON <i>et al.</i> (2017)
Antitumoral (linhagens A-549 e PC-3)	Extrato metanólico	Folhas	<i>In vitro</i>	YEDJOU <i>et al.</i> (2018a)
Antitumoral (linhagem HL-60)	Extrato metanólico	Folhas	<i>In vitro</i>	YEDJOU <i>et al.</i> (2018b)
Antitumoral (linhagem MCF 7)	Fração acetato de etila	Folhas	<i>In vitro</i>	FACHRUNISA <i>et al.</i> (2019)
Antitumoral (linhagem 4T1)	Fração acetato de etila	Folhas	<i>In vitro</i>	HASIBUAN <i>et al.</i> (2020)
Antitumoral Antimicrobiana	Extrato metanólico, frações hexânica, acetato de etila e aquosa	Folhas Tronco	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	CHUKWUEMEKA <i>et al.</i> (2018)

Imunomoduladora	Extrato aquoso	Folhas	<i>In vivo</i>	EZEONU <i>et al.</i> (2016)
Antiplasmódica Antioxidante Imunomoduladora	Extrato etanólico	Folhas	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	OMOREGIE e PAL (2016)
Antiplasmódica	Extrato metanólico	Folhas	<i>In vivo</i>	BIHONEGN <i>et al.</i> (2019)
Antidiabetogênica	Extrato aquoso	Folhas	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i> <i>Ex vivo</i>	ERUKAINURE <i>et al.</i> (2018)
Hipoglicemiante	Extrato hidroalcoólico	Toda a planta	<i>In vivo</i>	WU <i>et al.</i> (2018)
Hipoglicemiante	Extrato aquoso	Folhas	<i>In vivo</i>	OKON e UMOREN (2017)
Neuroprotetora	Extrato metanólico	Folhas	<i>In vivo</i>	OLADELE <i>et al.</i> (2020)
Neuroprotetora	Fração rica em alcaloides	Folhas	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	OBOH <i>et al.</i> (2020)
Antidiarreica	Extrato metanólico	Folhas	<i>In vivo</i>	MOSISA GUDETA <i>et al.</i> (2020)
Antidiarreica	Extrato metanólico	Folhas	<i>In vivo</i>	DEGU <i>et al.</i> (2020)
Gastroprotetora	Extrato metanólico	Folhas	<i>In vivo</i>	ADEFISAYO <i>et al.</i> (2017)
Vasorelaxante	Extrato etanólico	Folhas	<i>In vivo</i>	CH'NG <i>et al.</i> (2017)

	Restauração da função renal	Extrato metanólico	Folhas	<i>In vivo</i>	ACHUBA (2018)
	Antiulcerogênica	Extrato metanólico	Folhas	<i>In vivo</i>	ADEFISAYO <i>et al.</i> (2018)
	Anti-helmíntica	Extrato aquoso	Folhas	<i>In vivo</i>	ADEDIRAN e UWALAKA (2015)
	Anti- <i>Toxoplasma</i>	Extrato etanólico e hidroetanólico	Folhas Casca	<i>In vitro</i>	DÉGBÉ <i>et al.</i> (2018)
	Antifúngica	Extrato aquoso, frações metanólica, hexânica e diclorometano	Folhas	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	YUSOFF <i>et al.</i> (2020)
	Carrapaticida	Extrato metanólico	Folhas	<i>In vitro</i>	KEMAL <i>et al.</i> (2020)
	Antitóxica (intoxicação por metais pesados)	Extrato etanólico	Folhas	<i>In vivo</i>	BARNES <i>et al.</i> (2020)
	Antitumoral (linhagens A549, HeLa e MDA-MB-231)	Compostos isolados (lactonas sesquiterpênicas)	Sementes	<i>In vitro</i>	ITO <i>et al.</i> (2016)
	Anti-inflamatória Antioxidante	Extrato hexânico	Sementes	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	JAMIL <i>et al.</i> (2017)
<i>V. anthelmintica</i>	Indutora de melanogênese	Óleo essencial	Sementes	<i>In vitro</i>	AOBULI <i>et al.</i> (2018)
	Anti-psoríase	Extrato metanólico e diclorometano	Frutos	<i>In vivo</i>	DOGRA <i>et al.</i> (2018)
	Hipoglicêmica Hepatoprotetora	Extrato hexânico	Sementes	<i>In vivo</i>	JAMIL <i>et al.</i> (2018)

	Anti-vitiligo	Extrato etanólico e composto isolado (1,5-D iCQA)	Sementes	<i>In vitro</i>	MAMAT <i>et al.</i> (2018)
<i>V. calvoana</i>	Cardioprotetora Hipolipidêmica	Extrato etanólico	Folhas	<i>In vivo</i>	EGBUNG <i>et al.</i> (2017)
	Antitumoral (linhagem OVCAR-3)	Extrato metanólico e frações	Folhas	<i>In vitro</i>	MBEMI <i>et al.</i> (2020)
<i>V. cinerea</i>	Antitumoral (linhagens HeLa, A549, MCF 7 e Caco-2)	Extrato etanólico, frações etanólica, metanólica e butanólica	Toda a planta	<i>In vitro</i>	APPADATH BEERAN <i>et al.</i> (2014)
	Antioxidante Antimicrobiana	Extrato metanólico, frações hexânica, clorofórmica e acetato de etila	Toda a planta	<i>In vitro</i>	SONIBARE <i>et al.</i> (2016)
	Antioxidante	Extrato aquoso	Mistura de folhas, flores e sementes	<i>In vitro</i>	KETSUWAN <i>et al.</i> (2017)
	Antidiabetogênica	Extrato aquoso	Toda a planta	<i>In vivo</i>	NAOWABOOT <i>et al.</i> (2018)
<i>V. condensata</i>	Antiulcerogênica	Extrato etanólico	Folhas	<i>In vivo</i>	BOEING <i>et al.</i> (2016)
	Antitumoral (linhagens Reh, Nalm6, K562 Molt4 e MCF 7)	Extrato aquoso	Folhas	<i>In vitro</i>	THOMAS <i>et al.</i> (2016)
	Hepatoprotetora Antioxidante Anti-inflamatória	Fração acetato de etila	Folhas	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	SILVA <i>et al.</i> (2017)

	Antibiótico	Extrato etanólico, hexânica, acetato de etila e diclorometano	Folhas	<i>In vitro</i>	DA SILVA <i>et al.</i> (2018b)
<i>V. divaricata</i>	Antitumoral (linhagens MCF-7, PC-3 e HL-60)	Extrato metanólico e hexânico	Tronco Folhas	<i>In vitro</i>	LOWE <i>et al.</i> (2014)
<i>V. elaeagnifolia</i>	Antiulcerogênica	Extrato metanólico	Partes aéreas	<i>In vivo</i>	NAWALE <i>et al.</i> (2019)
<i>V. fimbriifera</i>	Antiplasmódica	Extrato acetato de etila	Folhas	<i>In vitro</i>	LEDOUX <i>et al.</i> (2018)
<i>V. kotschyana</i>	Antiulcerogênica	Extrato aquoso e polissacarídeos isolados	Raiz	<i>In vitro</i>	INNGJERDINGEN <i>et al.</i> (2014)
	Antioxidante	Extrato aquoso e frações (clorofórmica, etanólica e acetato de etila)	Raízes	<i>In vitro</i>	VASINCU <i>et al.</i> (2014)
<i>V. lasiopus</i>	Anti-Trypanosoma	Fração hexânica, metanólica, diclorometânica, acetato de etila e compostos isolados	Partes aéreas	<i>In vitro</i>	KIMANI <i>et al.</i> (2017)
	Antioxidante	Extrato metanólico	Folhas	<i>In vitro</i>	MUTHONI GUCHU <i>et al.</i> (2020)
<i>V. mespilifolia</i>	Antimicrobiana Antioxidante	Extrato etanólico e acetônico	Toda a planta	<i>In vitro</i>	UNUOFIN <i>et al.</i> (2018)
<i>V. patula</i>	Anti-inflamatória	Extrato etanólico	Partes aéreas	<i>In vitro</i>	WU <i>et al.</i> (2020)
	Antinociceptiva Sedativa	Extrato etanólico	Partes aéreas	<i>In vivo</i>	SIRAJ <i>et al.</i> (2020)

<i>V. polyanthes</i>	Anti-inflamatória	Extrato hexânico e acetato de etila	Folhas	<i>In vivo</i>	RODRIGUES <i>et al.</i> (2016)
<i>V. polysphaera</i>	Anti-inflamatória	Extrato hidroalcolóico	Folhas	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	OLIVEIRA <i>et al.</i> (2019)
<i>V. scorpioides</i>	Antitumoral	Fração hexânica, diclorometânica, acetato de etila e composto isolado (diacetilpiptocarfol)	Flores Folhas	<i>In vivo</i>	SCHEFER <i>et al.</i> (2017)

Relacionado à atividade anti-*Leishmania* do gênero, poucos trabalhos foram realizados até o momento, principalmente estudos *in vitro* e em formas promastigotas, por serem tecnicamente mais viáveis (Tabela 2).

Tabela 2. Espécies de *Vernonia* com atividade leishmanicida

Espécie de <i>Vernonia</i>	Espécie de <i>Leishmania</i>	Extrato, fração ou composto	Modelo	Referência
<i>V. amygdalina</i>	<i>L. major</i>	Extrato aquoso, metanólico e hexânico	<i>In vitro</i> <i>In vivo</i>	ALAWA <i>et al.</i> (2012)
	<i>L. aethiopica</i>	Extrato metanólico e clorofórmico	<i>In vitro</i>	TADESSE <i>et al.</i> (1993)
<i>V. brachycalyx</i>	<i>L. major</i>	Compostos isolados	<i>In vitro</i>	OKETCH-RABAH <i>et al.</i> (1997)
	<i>L. major</i>	Composto isolado	<i>In vitro</i>	OKETCH-RABAH <i>et al.</i> (1998)
<i>V. brasiliana</i>	<i>L. amazonensis</i>	Óleo essencial	<i>In vitro</i>	MARTINS <i>et al.</i> (2015)
<i>V. polyanthes</i>	<i>L. amazonensis</i> e <i>L. chagasi</i>	Extrato metanólico	<i>In vitro</i>	BRAGA <i>et al.</i> (2007)
	<i>L. infantum</i>	Óleo essencial	<i>In vitro</i>	MOREIRA <i>et al.</i> (2017)

Quanto à espécie *Vernonia brasiliana* Druce, as atividades farmacológicas descritas na literatura referem-se ao efeito antiplasmódico (ALVES *et al.*, 1997; CARVALHO e KRETTLI, 1991; CARVALHO *et al.*, 1991), inseticida e tripanocida (ROJAS DE ARIAS *et al.*, 1995), antimicrobiano (FILIZOLA, 2003; MAIA *et al.*, 2010) e leishmanicida (CORTEZ DE SÁ, 2015; MARTINS *et al.*, 2015).

Logo, diante da escassez de pesquisas tanto sobre a espécie em questão, bem como sobre seu potencial leishmanicida, ressalta-se a importância da realização de novos estudos, dada a relevância clínica e epidemiológica da leishmaniose, aliada à disponibilidade do recurso vegetal.

3 OBJETIVOS

3.1 Geral

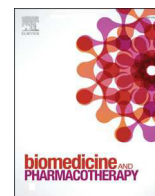
- Avaliar a atividade leishmanicida *in vitro* do óleo essencial das folhas de *Vernonia brasiliiana*.

3.2 Específicos

- Identificar por meio de análise cromatográfica os constituintes químicos do óleo essencial das folhas de *V. brasiliiana*;
- Determinar a citotoxicidade do óleo essencial de *V. brasiliiana* em células da linhagem DH82;
- Avaliar a atividade leishmanicida *in vitro* do óleo essencial de *V. brasiliiana* em formas promastigotas de *Leishmania infantum*;
- Descrever a ultraestrutura de formas promastigotas de *L. infantum* após tratamento com o óleo essencial de *V. brasiliiana*;
- Elucidar o mecanismo de ação do óleo essencial de *V. brasiliiana* em formas promastigotas de *L. infantum*, através da determinação do potencial de membrana mitocondrial, da produção de espécies reativas de oxigênio e da indução de apoptose;
- Analisar o efeito da interação entre o óleo essencial e a droga de referência miltefosina em formas promastigotas de *L. infantum*.

CAPÍTULO 1. *Vernonia brasiliiana* (L.) Druce induces ultrastructural changes and apoptosis-like death of *Leishmania infantum* promastigotes

Artigo publicado no periódico Biomedicine and Pharmacotherapy
(Qualis A2, fator de impacto 4.545/ JCR 2019)



Original article

Vernonia brasiliiana (L.) Druce induces ultrastructural changes and apoptosis-like death of *Leishmania infantum* promastigotes

Renata Mondêgo-Oliveira^a, Joicy Cortez de Sá Sousa^b, Carla Junqueira Moragas-Tellis^c, Paulo Victor Ramos de Souza^{c,d}, Maria do Socorro dos Santos Chagas^c, Maria Dutra Behrens^c, Daiana de Jesús Hardoim^e, Noemi Nosomi Taniwaki^f, Thaize Quiroga Chometon^g, Alvaro Luiz Bertho^h, Kátia da Silva Calabrese^{e,*}, Fernando Almeida-Souza^{e,i,1,*}, Ana Lucia Abreu-Silva^{a,i,1}

^a Rede Nordeste de Biotecnologia, Universidade Federal do Maranhão, 65080-805, São Luís, Maranhão, Brazil

^b Universidade CEUMA, 65075-120, São Luís, Maranhão, Brazil

^c Laboratório de Produtos Naturais para Saúde Pública (LPNSP), Instituto de Tecnologia em Fármacos - Farmanguinhos, Fiocruz, 21041-000, Rio de Janeiro, Brazil

^d Programa de Pós Graduação Acadêmico em Pesquisa Translacional em Fármacos e Medicamentos, Instituto de Tecnologia em Fármacos - Farmanguinhos, Fiocruz, 21041-000, Rio de Janeiro, Brazil

^e Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, 21040-900, Rio de Janeiro, Brazil

^f Núcleo de Microscopia Eletrônica, Instituto Adolfo Lutz, 01246-000, São Paulo, Brazil

^g Plataforma Tecnológica de Citometria de Fluxo, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

^h Laboratório de Imunoparasitologia, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

ⁱ Universidade Estadual do Maranhão, 65055-310, São Luís, Maranhão, Brazil



ARTICLE INFO

Keywords:

β -caryophyllene
DH82 cells
Flow cytometry
Isobologram
Leishmaniasis
Transmission electron microscopy

ABSTRACT

The present study aimed to evaluate the antileishmanial effect, the mechanisms of action and the association with miltefosine of *Vernonia brasiliiana* essential oil against *Leishmania infantum* promastigotes. This essential oil was obtained by hydrodistillation and its chemical composition was determined by gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS). The antileishmanial activity against *L. infantum* promastigotes and cytotoxicity on DH82 cells were evaluated by MTT colorimetric assay. Ultrastructural alterations were evaluated by transmission electron microscopy. Changes in mitochondrial membrane potential, in the production of reactive oxygen species, and analysis of apoptotic events were determined by flow cytometry. The association between the essential oil and miltefosine was evaluated using the modified isobologram method. The most abundant component of the essential oil was β -caryophyllene (21.47 %). Anti-*Leishmania* assays indicated an IC₅₀ of $39.01 \pm 1.080 \mu\text{g/mL}$ for promastigote forms after 72 h of treatment. The cytotoxic concentration for DH82 cells was $63.13 \pm 1.211 \mu\text{g/mL}$ after 24 h of treatment. The effect against *L. infantum* was proven through the ultrastructural changes caused by the oil, such as kinetoplast and mitochondrial swelling, vesicles in the flagellar pocket, discontinuity of the nuclear membrane, nuclear fragmentation and condensation, and loss of organelles. It was observed that the oil leads to a decrease in the mitochondrial membrane potential (35.10 %, $p = 0.0031$), increased reactive oxygen species production, and cell death by late apoptosis (17.60 %, $p = 0.020$). The combination of the essential oil and miltefosine exhibited an antagonistic effect. This study evidences the antileishmanial action of *V. brasiliiana* essential oil against *L. infantum* promastigotes.

* Corresponding authors at: Laboratório de Imunomodulação e Protozoologia, Pavilhão Carlos Chagas, Instituto Oswaldo Cruz, Fiocruz, 21040-900, Manguinhos, Rio de Janeiro, Brazil.

E-mail addresses: re_mondego@hotmail.com (R. Mondêgo-Oliveira), joicyvet@hotmail.com (J.C. de Sá Sousa), carla.tellis@far.fiocruz.br (C.J. Moragas-Tellis), pvr.pvr@gmail.com (P.V.R. de Souza), msocchagas@gmail.com (M.S. dos Santos Chagas), mariabehrens@hotmail.com (M.D. Behrens), hardoim@ioc.fiocruz.br (D. Jesús Hardoim), ntaniwak@hotmail.com (N.N. Taniwaki), thaizeqcp@gmail.com (T.Q. Chometon), alvaro.bertho@ioc.fiocruz.br (A.L. Bertho), calabrese@ioc.fiocruz.br (K.S. Calabrese), fernandoalsouza@gmail.com (F. Almeida-Souza), abreusilva.ana@gmail.com (A.L. Abreu-Silva).

¹ Both authors contributed equally to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.bioph.2020.111025>

Received 6 October 2020; Received in revised form 8 November 2020; Accepted 15 November 2020

Available online 27 November 2020

0753-3322/© 2020 The Author(s).

Published by Elsevier Masson SAS. This is an open access article under the CC BY license

(<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

1. Introduction

Leishmaniasis is a neglected zoonosis that affects mainly the impoverished population and those living under a situation of social and economic vulnerability [1]. It is an infectious, non-contagious, and chronic disease caused by *Leishmania* protozoa and spread by the bite of an infected female sandfly [2].

Dogs are the most important domestic reservoir of *L. infantum*, the causative agent of canine leishmaniasis (CanL), and also the main source of infection of the vector. Thus, their presence in endemic areas represents a risk factor for the development of the human disease [3]. The canine disease presents numerous clinical signs, including cutaneous and visceral signs, but the majority of animals can remain asymptomatic for years [4].

The treatment of leishmaniasis is still a challenge, especially for CanL. The development of the first chemotherapeutic drugs occurred several decades ago. The so-called first-line drugs are now antique and disadvantageous but still are used. When sick animals no longer respond to therapy with pentavalent antimonials, there are other options available, such as allopurinol, amphotericin B, pentamidine, paromomycin, domperidone, and miltefosine. Among the mentioned drugs, miltefosine stands out as the first oral drug approved for treating CanL [4]. Even so, there are barriers to a proper treatment, as the cost of medications, adverse effects, unsatisfactory clinical responses, and the emergence of resistant parasite strains. Therefore, there is a need to look for alternative therapeutic strategies that are cheaper, more effective, and accessible to the population [5,6].

One of the pathways for the formulation of new drugs is the use of plants as sources of new bioactive compounds [7]. Crude extracts and essential oils have chemical constituents with a variety of biological activities, which can be attributed to the presence of secondary metabolites, such as alkaloids, phenolic compounds, and terpenes [8]. Among the plants used for medicinal purposes, we highlight those belonging to the genus *Vernonia*.

The *Vernonia* genus belongs to the Asteraceae family, also known as Compositae, and to the Vernoniae tribe. Numerically, it is one of the largest genera of the family, with approximately 1000 species [9]. It comprises shrubs, lianas, and trees, distributed mainly in tropical regions, and routinely used as part of traditional medicine [10]. The traditional use of *Vernonia* is mostly widespread in Africa, although Brazil has the largest number of species. They are used in the treatment of amebiasis, malaria, sexually transmitted diseases, in addition to being useful in combating stress and as an aphrodisiac [11,12]. Several of its pharmacological properties have been proved, as the antiparasitic effect against obligate intracellular parasites, as *Trypanosoma brucei rhodesiense* [13], *Toxoplasma gondii* [14], *Plasmodium* spp. [15,16], and *Leishmania* spp. [17–23].

Concerning antileishmanial action, extracts [17,18], fractions [19], isolated compounds [20,21], and essential oils [22,23] of four species of *Vernonia* were tested and showed activity against *Leishmania* spp. However, except for one study, the biological effect was evident only against species responsible for cutaneous leishmaniasis. Only Moreira et al. [23] points out the leishmanicidal action against *L. infantum*. In this study, the essential oil of *V. polyanthes* was tested and displayed a significant activity against *L. infantum* promastigote forms, with IC₅₀ value of 19.4 µg/mL.

V. brasiliana is typical of the Brazilian territory and is used in popular medicine, especially by indigenous peoples, quilombolas, and riverside populations [24]. When compared to other specimens of the genus, its biological properties are not as explored. The number of reports in the literature is reduced and restricted to antimicrobial [25], insecticidal and trypanocidal [26], antiplasmodial [27–29], and anti-*Leishmania amazonensis* actions [22,30]. Both studies with *L. amazonensis* assessed the essential oil from the leaves of *V. brasiliana* against promastigote forms. Moreover, Cortez de Sá also evaluated the ultrastructural changes caused by the essential oil and evidenced that it led to damages that

compromise parasite viability [30].

Due to the clinical and epidemiological relevance of CanL, there is a need to search for bioactive compounds with properties against *L. infantum* to be used as a therapeutic alternative. Thus, this study aimed to evaluate the antileishmanial effect of *V. brasiliana* essential oil (VBEO) in *L. infantum*, describe its mechanism of action and investigate the interaction of VBEO and miltefosine in promastigote forms.

2. Material and methods

2.1. Reagents

The reagents 2, 7-dichlorodihydro-fluorescein (H₂DCFDA), 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT), Dulbecco's modified Eagle's medium (DMEM), dimethyl sulfoxide (DMSO), EPON 812 resin, glutaraldehyde, hydrogen peroxide, miltefosine, osmium tetroxide, Schneider's insect medium, and streptomycin were purchased from Sigma-Aldrich (St. Louis, MO, USA). Fetal bovine serum (FBS), L-glutamine, and penicillin were acquired from Gibco (Gaithersburg, MD, USA). FITC Annexin V/Dead Cell Apoptosis Kit was obtained from Invitrogen™ (Carlsbad, CA, USA) and tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE) from Molecular Probes (Carlsbad, CA, USA).

2.2. Plant material

V. brasiliana leaves were collected in the city of Santa Luzia, Maranhão State, Brazil (4° 13' 43.6" S 45° 59' 51.4" W). The plant material was identified at the Herbarium "Prisco Bezerra" of the Universidade Federal do Ceará, and a voucher specimen was deposited under number 55227.

2.3. Essential oil extraction

The leaves were dried and submitted to hydrodistillation for the obtention of the essential oil [31]. An aliquot was sent to the Instituto de Tecnologia em Fármacos (FIOCRUZ/RJ) for chemical identification through gas chromatography-mass spectrometry (GC-MS).

2.4. Gas chromatography-mass spectrometry analyses (GC-MS)

The essential oil from *V. brasiliana* leaves was dissolved in ethyl acetate (1 mg/mL) and analyzed on a Shimadzu QP 5000 gas chromatograph, with ZB-5 ms capillary column (5 % phenyl arylene 95 % dimethylpolysiloxane) coupled at 70 eV (40–500 Da) HP 5MS mass selective detector of electronic impact, with a transference temperature of 280 °C. Chromatographic analyses were carried out under the following conditions: volume injection of 0.3 µL of ethyl acetate, helium as carrier gas (99.99 %), injector temperature of 280 °C, split mode (1:10), the initial temperature of 40 °C (5 min) and final temperature of 300 °C (7.5 min) [32]. Peak areas and retention times were measured by an electronic integrator. The relative amounts of individual compounds were computed from GC peak areas without FID response factor correction. The identification of essential oil components was achieved based on similarity with data from Wiley Registry of Mass Spectral Data, 7th Edition (Wiley Interscience, New York).

2.5. Parasites

Promastigote forms of *L. infantum* (MCAN/BR/2014/21BAÇO) were cultured at 26 °C in Schneider's Insect Medium (Sigma, St. Louis, MO, USA), supplemented with 20 % fetal bovine serum (FBS) (Gibco, Gaithersburg, MD, USA), 100 U/mL of penicillin (Gibco, Gaithersburg, MD, USA), 100 µg/mL of streptomycin (Sigma, St. Louis, MO, USA) and 2% sterile male human urine.

2.6. Cell culture

Canine macrophage cell line DH82 (ATCC® CRL-10389™) was cultured in DMEM medium (Sigma, St. Louis, MO, USA), supplemented with 15 % FBS, penicillin (100 U/mL), streptomycin (100 µg/mL) and 2 mM of L-glutamine (Gibco, Gaithersburg, MD, USA), at 37 °C and 5% CO₂.

2.7. Activity against promastigote forms

L. infantum promastigotes (10⁶ parasites/mL) were plated into 96-well plates and treated with different concentrations obtained by serial dilutions 1:2 of VBEO (100–3.125 µg/mL), with a final volume of 100 µL/well. After 72 h incubation, the viability of the parasites was measured by the modified colorimetric method with tetrazolium-dye 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) [33]. 10 µL of MTT (5 mg/mL) was added in each well and after four hours, 80 µL of DMSO was added to dissolve the formazan crystals. The absorbance was analyzed on a spectrophotometer at a wavelength of 570 nm. Data were normalized using the formula:

$$\% \text{ survival} = \frac{\text{sample OD} - \text{blank OD}}{\text{control OD} - \text{blank OD}} \times 100$$

The results were used to calculate the IC₅₀ (inhibitory concentration for 50 % of parasites). Miltefosine (40–1.25 µg/mL) was used as a reference drug.

2.8. Cytotoxicity assay

DH82 cells were seeded in 96-well plates (5 × 10⁵ cells/mL) and treated with different concentrations obtained by serial dilutions 1:2 of the essential oil (250–1.95 µg/mL). After 24 h, cell viability was measured by MTT colorimetric assay. 10 µL of MTT was added in each well and after four hours, the medium was discarded and then 50 µL of DMSO was added. Data were normalized using the aforementioned formula, for CC₅₀ (cytotoxic concentration for 50 % of cells) calculation. Miltefosine was used as a control (100–3.125 µg/mL).

2.9. Transmission electron microscopy

Promastigote forms of *L. infantum* were treated with the essential oil at the IC₅₀ concentration for 72 h. The parasites were then fixed with 2.5 % glutaraldehyde in 0.1 M sodium-cacodylate buffer (pH 7,4) overnight, post-fixed in a 1 % osmium tetroxide solution, washed in 0.1 M sodium-cacodylate buffer, dehydrated in acetone series, and embedded in EPON 812 resin. Ultrathin sections were obtained from 100 nm cuts in Sorvall MT 2-B (Porter Blum) ultramicrotome (Sorvall, Newtown, CT, USA) stained with 5 % uranyl acetate aqueous solution and lead citrate (1.33 % lead nitrate and 1.76 % sodium citrate), and examined in a transmission electron microscope JEM-1011 (JEOL, Tokyo, Japan) operating at 80 kV [34]. Images were recorded with a Gatan 785 ES1000W Erlangshen camera.

2.10. Determination of mitochondrial membrane potential (MMP) (ΔΨ_m)

L. infantum promastigotes (2 × 10⁶ parasites/mL) were treated with VBEO for 72 h, at the IC₅₀ concentration. Parasites were centrifuged at 1500 rpm for 5 min at room temperature, washed in PBS, incubated with 300 µL of tetramethylrhodamine ethyl ester (TMRE, 50 nM) in the dark for 15 min, at room temperature, and submitted to flow cytometry. Parasites killed by heat (60 °C, 1 h) and parasites treated with 1% DMSO were used as positive and negative controls, respectively.

2.11. Detection of reactive oxygen species (ROS) production

ROS production was evaluated using fluorescent indicator 2, 7-

dichlorodihydro-fluorescein (H₂DCFDA). *L. infantum* promastigotes (2 × 10⁶ parasites/mL) were treated with the essential oil for 72 h at 26 °C, at the IC₅₀ concentration. Then, the parasites were centrifuged, washed with PBS, and incubated with 150 µL of H₂DCFDA (5 µM) for 30 min in the dark, at room temperature. The H₂DCFDA-fluorescence intensity was measured by flow cytometry and hydrogen peroxide (50 µM) and parasites treated with 1% DMSO were used as positive and negative controls, respectively.

2.12. Detection of *L. infantum* apoptosis by flow cytometry

For analysis of parasite apoptosis (phosphatidylserine (PS) externalization) and necrosis (plasma membrane integrity), we used the FITC Annexin V-FITC and propidium iodide (PI)/ Dead Cell Apoptosis Kit (Invitrogen™), according to the manufacturer's instructions, followed by flow cytometry analysis. Briefly, promastigote forms of *L. infantum* (2 × 10⁶ parasites/mL) were incubated with the essential oil of *V. brasiliensis* at the IC₅₀ concentration for 72 h at 26 °C. Parasites were centrifuged at 1500 rpm for 5 min at room temperature, washed in PBS, resuspended in 100 µL of 1X annexin-binding buffer, 5 µL of annexin V and 1 µL of PI (100 µg/mL). After 15 min of incubation, protected from light, at room temperature, 400 µL of 1X annexin-binding buffer was added in each sample. From analysis, promastigotes were classified according to their staining as apoptotic parasites (annexin V⁺; PI^{neg}), late apoptotic/necrotic parasites (annexin V⁺; PI⁺), and viable parasites (annexin V^{neg}; PI^{neg}). Miltefosine (50 µM) was used as an antileishmanial reference drug and untreated parasites as control.

2.13. Flow cytometry

Twenty thousand-event acquisitions were performed on Beckman Coulter CytoFlex flow cytometer. The limits for the quadrant markers in dot plots and histograms were set based on non-staining controls. The flow cytometric analyses to determine the MMP, ROS and apoptosis was performed using CytoExpert software (Beckman Coulter, Inc., Brea, CA, USA). TMRE, H₂DCFDA, Annexin V-FITC and PI fluorescence were excited by 488nm-blue laser and their fluorescence were collected at 585/42; 525/40; 525/40; and 610/20 bandpass filters, respectively.

2.14. Determination of drug interactions

The interaction between VBEO and miltefosine in *L. infantum* promastigotes was evaluated using the modified isobologram method [35]. The IC₅₀ of both compounds, previously obtained, were used to establish the maximum concentration of each drug in the combination. The highest concentrations of the solutions were prepared in proportions of 4:1, 3:2, 2:3 and 1:4 of VBEO and miltefosine, as follows:

Association 1 (4:1): 80 % of VBEO (240 µg/mL) + 20 % of miltefosine (20 µg/mL).

Association 2 (3:2): 60 % of VBEO (180 µg/mL) + 40 % of miltefosine (40 µg/mL).

Association 3 (2:3): 40 % of VBEO (120 µg/mL) + 60 % of miltefosine (60 µg/mL).

Association 4 (1:4): 20 % of VBEO (60 µg/mL) + 80 % of miltefosine (80 µg/mL).

The experiments were performed in the same way as for the determination of antileishmanial activity, described in item 2.7. After 72 h of incubation, parasite viability was measured by MTT colorimetric method and the absorbance was analyzed on a spectrophotometer, at a wavelength of 570 nm. After data normalization, fractional inhibitory concentrations (FIC) at the IC₅₀ level were calculated for both drugs, as follows: FIC₅₀ = IC₅₀ drugs in combination/IC₅₀ drug alone. FIC₅₀s of each drug ratio (1:4, 2:3, 3:2 and 4:1) were used to build the isobologram. Later, the sum of the FIC₅₀s for each ratio was determined (∑FIC₅₀ = FIC₅₀ VBEO + FIC₅₀ miltefosine) and then, the fractional

inhibitory concentration index (FICI) was calculated, as an overall mean of $\sum \text{FIC}_{50}$ s. The value obtained was used to classify the nature of the interaction as synergistic ($\text{FICI} < 0.5$), additive ($0.5 < \text{FICI} < 4$) or antagonist ($\text{FICI} > 4$) [36]. Five independent assays were performed, each one in octuplicate.

2.15. Statistical analysis

Values were expressed as mean \pm standard deviation. The results were analyzed by the Kruskal–Wallis test, followed by Dunn's multiple comparison test. Statistical analyses were performed with GraphPad Prism 7.00 software (San Diego, CA, USA) and differences were considered significant when $p < 0.05$.

3. Results

3.1. Chemical composition

To identify and quantify the chemical constituents present in the essential oil extracted from *V. brasiliiana*, a chromatographic analysis was done, and the compounds found were listed according to retention time. Gas chromatography-mass spectrometry (GC–MS) revealed the presence of 28 compounds, of which the main constituents detected were β -caryophyllene (peak 7, 21.47 %), followed by germacrene-D (peak 15, 14.57 %), caryophyllene oxide (peak 23, 10.28 %), α -humulene (peak 10, 8.85 %), and α -copaene (peak 4, 5.15 %) as presented at Table 1, Fig. 1 and Supplementary material (Fig. S1–S5). VBEO was mostly composed of sesquiterpenes but presents a small fraction of monoterpenes (terpinen-4-ol) and norisoprenoids (β -ionone).

Table 1

Chemical composition of *Vernonia brasiliiana* essential oil.

<i>Vernonia brasiliiana</i> essential oil			
Peaks	Compounds	Rt (min)	Content (Peak Area %)
1	terpinen-4-ol	7.18	0.1
2	α -cubenene	9.617	0.11
3	Ciclosativene	9.981	0.2
4	α -copaene	10.062	5.15
5	β -bourbonene	10.196	2.15
6	α -gurjunene	10.523	0.43
7	β -caryophyllene	10.746	21.47
8	β -cubenene	10.857	0.87
9	Isolodene	10.894	0.12
10	α -humulene	11.236	8.85
11	Alloaromadendrene	11.295	3.03
12	Aromadendrene	11.295	3.03
13	α -amorphene	11.466	0.99
14	β -ionone	11.526	0.55
15	Germacrene-D	11.593	14.57
16	α -elemene	11.704	0.32
17	α -muurolene	11.778	2.95
18	γ -cadinene	12.001	0.46
19	δ -cadinene	12.046	2.71
20	cis-calamenene	12.113	0.55
21	α -calacorene	12.677	0.34
22	Spathulenol	12.9	2.35
23	Caryophyllene oxide	12.982	10.28
24	salvial-4(14)-en-1-one	13.108	0.74
25	Viridiflorene	13.264	0.71
26	(3E,5E,8Z)-3,7,11-Trimetildodeca-1,3,5,8,10-pentaene	13.383	0.68
27	τ -muurolol	13.747	1.81
28	τ -cadinol	13.91	1.13

Rt: retention time (minutes) of the compounds in column. Peak Area %: percentage of the normalized area which indicates the relative distribution of the compounds in the sample.

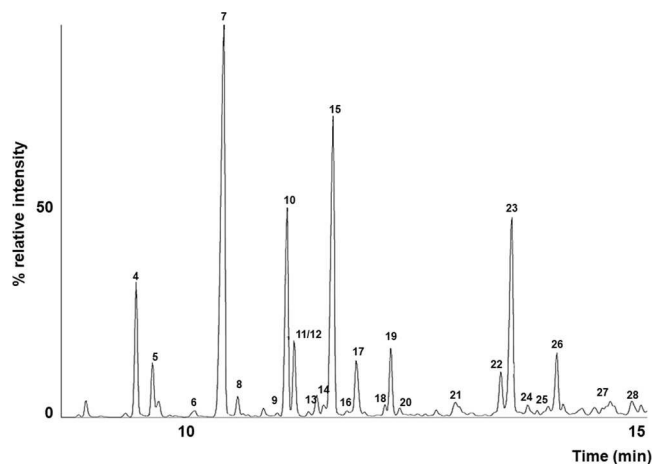


Fig. 1. Total ion chromatogram registered by GC–MS of *Vernonia brasiliiana* essential oil showing 28 peaks of which stand out the major compounds: β -caryophyllene (7) ($R_t=10.74$ min; 21.47 %), germacrene-D (15) ($R_t=11.59$ min; 14.57 %), caryophyllene oxide (23) ($R_t=12.98$ min; 10.28 %), α -humulene (10) ($R_t=11.23$ min; 8.85 %), and α -copaene (4) ($R_t=10.06$ min; 5.15 %). The mass spectra of majority compounds identified are presented at supplementary material (S1–S5).

3.2. Anti-Leishmania activity and cytotoxicity

Antileishmanial activity assays were performed to evaluate the effect of the essential oil in promastigote forms of *L. infantum*. The results showed that VBEO had a concentration-dependent activity, with an IC_{50} value of 39.01 ± 1.080 $\mu\text{g/mL}$. In DH82 cells, the oil was cytotoxic at a concentration of 63.13 ± 1.211 $\mu\text{g/mL}$ (Fig. 2), indicating that VBEO was more toxic to the parasites than the cells. The reference drug miltefosine showed antileishmanial activity and cytotoxicity as expected (Table 2).

3.3. Ultrastructural changes

Transmission electron microscopy was used to investigate the effects of *V. brasiliiana* essential oil at the IC_{50} concentration (39.01 $\mu\text{g/mL}$) for 72 h on *L. infantum* promastigotes ultrastructure and morphology.

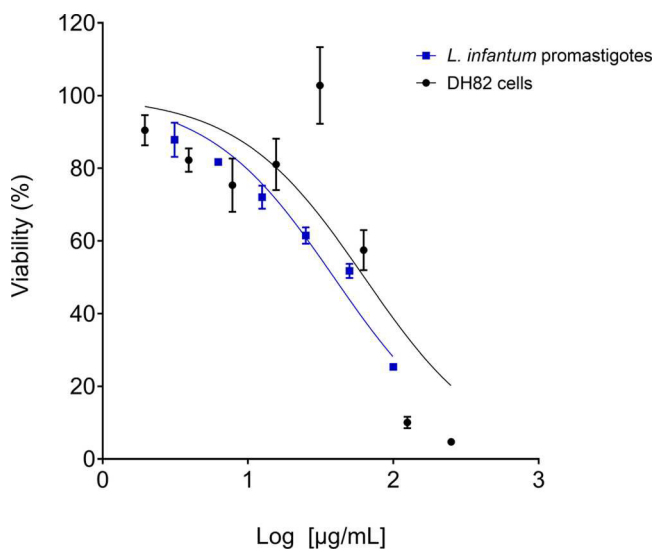


Fig. 2. Dose-response curve of the effects of *Vernonia brasiliiana* essential oil on the viability of *Leishmania infantum* promastigote forms and DH82 macrophages. Data represents the mean \pm standard error of five independent experiments carried out in triplicate.

Table 2

Antileishmanial activity, cytotoxicity, and selectivity index of *Vernonia brasiliensis* essential oil for 72 h of treatment.

Compounds	Cytotoxicity (DH82 cells)	<i>L. infantum</i> promastigotes	
	CC ₅₀ (µg/mL)	IC ₅₀ (µg/mL)	SI
VBEO	63.13 ± 1.211	39.01 ± 1.080	1.61
Miltefosine	2.541 ± 1.164	4.608 ± 1.110	0.55

Data represent mean ± SD. VBEO: *Vernonia brasiliensis* essential oil; CC₅₀: cytotoxic concentration for 50 % of cells; IC₅₀: inhibitory concentration for 50 % of parasites. SI: Selectivity index.

Untreated promastigotes showed preserved ultrastructure (Fig. 3A), while parasites treated with VBEO presented a variation in the morphology of the parasites to a more rounded shape. Swelling in the mitochondria (Fig. 3B) and kinetoplast (Fig. 3C and D), loss of mitochondrial cristae (Fig. 3B, star) and kinetoplast (Fig. 3C and D, asterisk), and formation of membranous and vesicular structures was noted in the flagellar pocket in *L. infantum* promastigotes (Fig. 3B and C, thin arrows). The nucleus showed a decondensation of chromatin surrounding the nuclear membrane (Fig. 3A), discontinuity of chromatin (Fig. 3B and C, thick arrows), absence of nucleolus, and dilatation of the nuclear membrane (Fig. 3D, thick arrows). Prominent nuclear changes were observed, such as chromatin fragmentation and dispersion (Fig. 4A,

white asterisk), irregular chromatin condensation (Fig. 4B and C), and nuclear pyknosis (Fig. 4D, arrowhead). Loss of cytoplasmic organelles (Fig. 4A, B, C, D), severe cytoplasm damage, and rupture of the plasma membrane were also observed (Fig. 4E).

3.4. Mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$)

Flow cytometry analyses were performed to evaluate the mitochondrial transmembrane potential and the results showed that VBEO leads to a significant decrease in the $\Delta\psi_m$ in *L. infantum* promastigotes. Untreated parasites showed 81.99 % of cells stained with TMRE. The treatment with VBEO at 39.01 µg/mL for 72 h caused mitochondrial damage and reduced the $\Delta\psi_m$ to 35.10 % ($p = 0.0031$) (Fig. 5).

3.5. ROS production

To investigate whether VBEO leads to ROS production, ROS levels were measured using the cell-permeable dye H₂DCFDA. The generation of ROS was enhanced to 65.93 ± 0.852 % in *L. infantum* promastigotes treated with VBEO at 39.01 µg/mL for 72 h ($p = 0.011$), compared to untreated parasites. Hydrogen peroxide (H₂O₂) was used as a control and it induced ROS formation to 72.78 ± 6.504 % ($p = 0.012$) (Fig. 6).

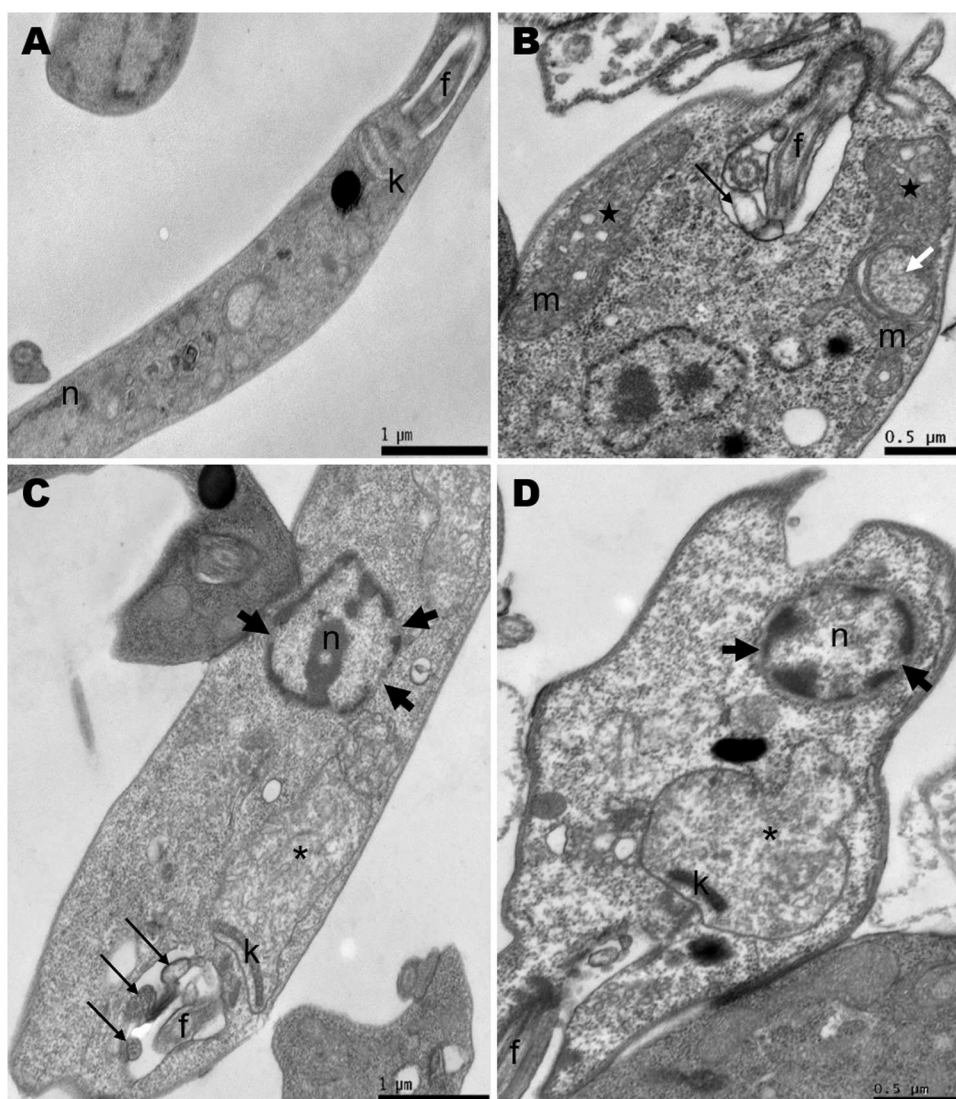


Fig. 3. Transmission electron microscopy of *Leishmania infantum* promastigotes treated with *Vernonia brasiliensis* (39.01 µg/mL) for 72 h. (A) Untreated control, with normal characteristics of the protozoan. (B) Mitochondrial swelling, with breakdown of mitochondrial cristae (star) and presence of a circular and granular material inside the organelle (white arrow); membranous and vesicular structures in the flagellar pocket (B and C, thin arrow), kinetoplast swelling (C and D, asterisk), and nucleus membrane discontinuity (C and D, block arrow). Dilatation of nuclear membrane and absence of nucleolus (D, block arrow). f: flagellum; k: kinetoplast; m: mitochondria; n: nucleus.

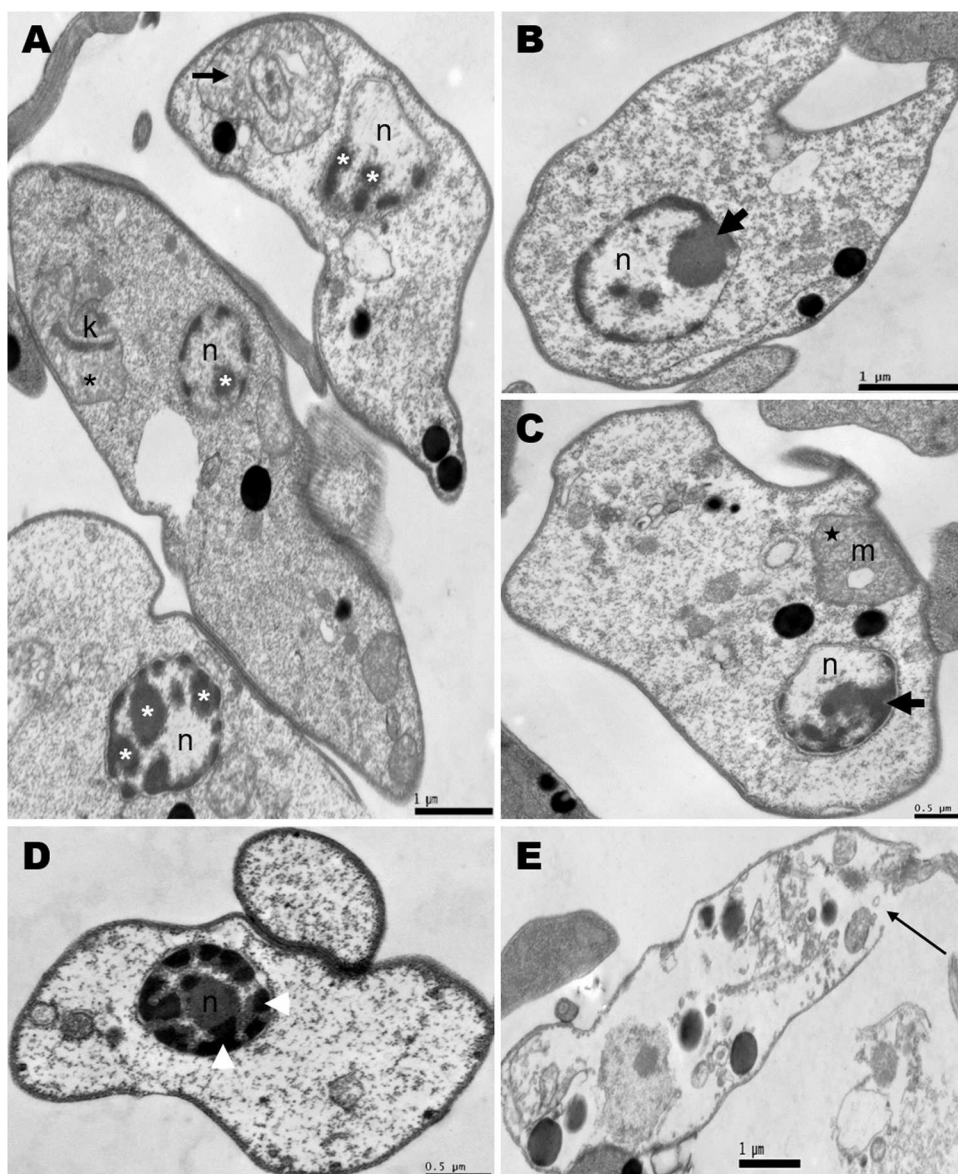


Fig. 4. Ultrastructural effects of *Vernonia brasiliiana* essential oil on *Leishmania infantum* promastigotes treated for 72 h. Marked changes in parasite morphology are observed. (A) Fragmentation and dispersion of nuclear chromatin (white asterisk), presence of an autophagosomal structure (arrow), and kinetoplast swelling (asterisk). (B-C) Loss of cytoplasmic organelles, and chromatin condensation (block arrow). In C, mitochondrial swelling and loss of cristae are also present (star). (D) Nuclear pyknosis (arrowhead) and rounding of the parasite. (E) Severe damage of the cytoplasm, rupture of the plasma membrane (thin arrow). k: kinetoplast; m: mitochondria; n: nucleus.

3.6. Evaluation of phosphatidylserine exposure and cell membrane integrity

To determine the mechanism of cell death triggered by VBEO, whether apoptosis or necrosis, the externalization of phosphatidylserine and cell membrane integrity were evaluated using Annexin V-FITC and PI staining. After treatment with VBEO for 72 h, the number of viable parasites decreased from 95.67 % to 68.82 %. The percentage of the necrotic population increased to 7.41 % ($p = 0.028$) and the apoptotic population increased to 6.17 % ($p = 0.022$), compared to untreated parasites. The intensity of Annexin-V and PI fluorescence was increased up to 17.60 % ($p = 0.020$) compared to the intensity of untreated parasites, suggesting a late apoptotic process. There is a statistically significant difference in the percentage of necrotic, late apoptotic, and apoptotic parasites (Fig. 7D-F) between the groups treated with VBEO and the reference drug miltefosine compared to the untreated group. These data demonstrate that the treatment with VBEO induces late apoptosis in *L. infantum* promastigotes.

3.7. Antileishmanial association of VBEO-miltefosine

The IC_{50} values for both drugs, alone and in each association, the fractional inhibitory concentrations and the fractional inhibitory concentration index are shown in Table 3. The interaction of VBEO and miltefosine was classified as antagonist, with a FIC index of 4.779.

In the first combination (4:1), no leishmanicidal activity was observed, since IC_{50} values obtained for the essential oil and miltefosine were higher than the top concentrations used in the experiments. It was also observed that IC_{50} values for the essential oil decreased at each combination rate (Fig. 8A). IC_{50} values increased for miltefosine, except in a 1:4 ratio (Fig. 8B). An isobologram was constructed based on the IC_{50} values of each association (Fig. 8C). Points corresponding to the FIC_{50} values of VBEO and miltefosine were connected by a tendency line. All points were located above the theoretical additive line, thus characterizing antagonism.

4. Discussion

In this study, we assessed the chemical composition of the essential oil extracted from the leaves of *V. brasiliiana*, its cytotoxicity against

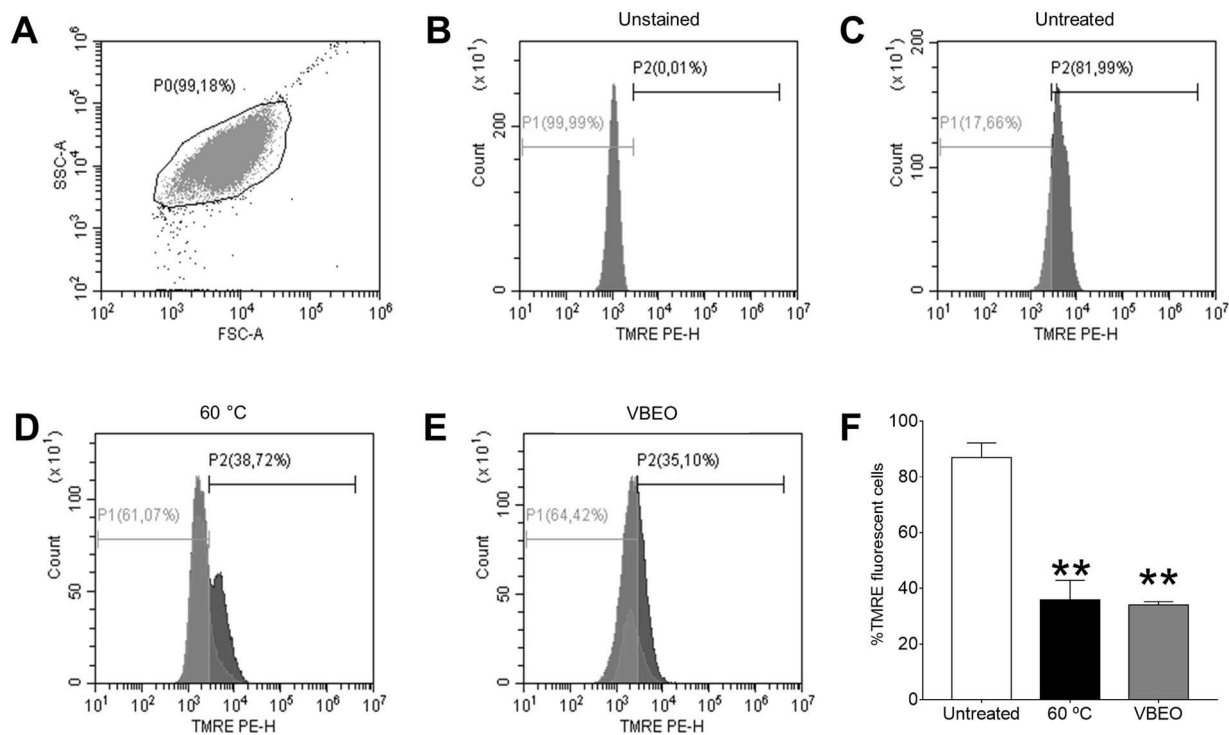


Fig. 5. Changes in the mitochondrial membrane potential in *Leishmania infantum* promastigotes incubated for 72 h with *Vernonia brasiliensis* essential oil. (A) Promastigotes captured in the gated region and representative histogram. (B) Unstained parasites. (C) Untreated parasites. (D) Promastigote forms of *L. infantum* killed by heat, standard protocol for assessing mitochondrial viability. (E) Statistically significant differences are observed in the percentage of cells marked with TMRE between the untreated group and the groups treated with VBEO and parasites killed by heat. (**) $p < 0.01$ when compared to untreated parasites by Mann-Whitney test.

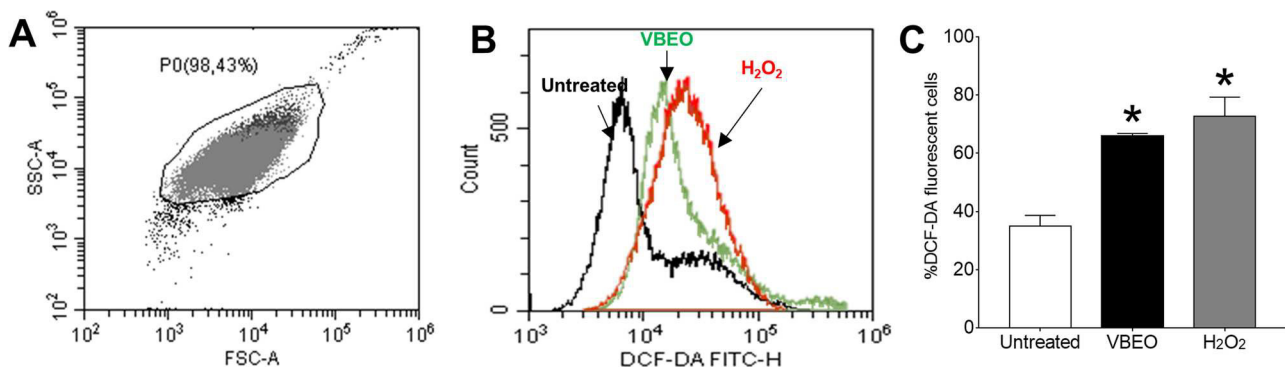


Fig. 6. Evaluation of intracellular ROS levels in *Leishmania infantum* promastigotes after incubation with *Vernonia brasiliensis* essential oil for 72 h. (A) Promastigotes captured in the gated region and representative histogram. (B) The green line shows increased ROS production in parasites treated with the essential oil when compared to control parasites (black line). The same was observed in the group treated with H₂O₂ (red line), a natural ROS inducer. (C) Statistically significant differences are observed in the percentage of parasites marked with H₂DCFDA between the untreated group and the groups treated with VBEO and H₂O₂. (*) $p < 0.05$ when compared to untreated parasites by Mann-Whitney test (For interpretation of the references to colour in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article).

DH82 cells, its anti-leishmanial action on *L. infantum* promastigotes, the alterations it induces in promastigote forms, and the effect of the combination of the essential oil with the reference drug miltefosine.

Our chromatographic analysis revealed that VBEO is rich in sesquiterpenes, which comprise 26 of the 28 compounds found. The first report of the chemical characterization of the essential oil from *V. brasiliensis* leaves was made by Maia et al. [25] that identified 8 substances, of which 7 were sesquiterpenes. Similarly, Cortez de Sá [30] found 7 compounds, all classified as sesquiterpenes. When comparing the results obtained by Martins et al. [22], they observed the presence of 53 chemical constituents, 17 belonging to the sesquiterpene class.

It is noticed that there is a variation in the number of compounds

found in each essential oil analyzed, which can be explained due to environmental variations (seasonality, rainfall rate, the incidence of UV rays, soil nutrients, plant age and stage of development, the time of day the plant was collected, etc.), that influences in the total content of secondary metabolites in plants [37]. However, despite quantitative differences, most of the components found in the cited studies belong to the same chemical family (terpenes). In addition, the major compounds in all studies mentioned, including ours, were the same (β -caryophyllene or germacrene-D), which may indicate that the essential oils of *V. brasiliensis* leaves follow a pattern in its chemical composition.

Except for salvia-4(14)-en-1-one and (3E,5E,8Z)-3,7,11-trimethyl-dodeca-1,3,5,8,10-pentaene, all compounds found in VBEO have

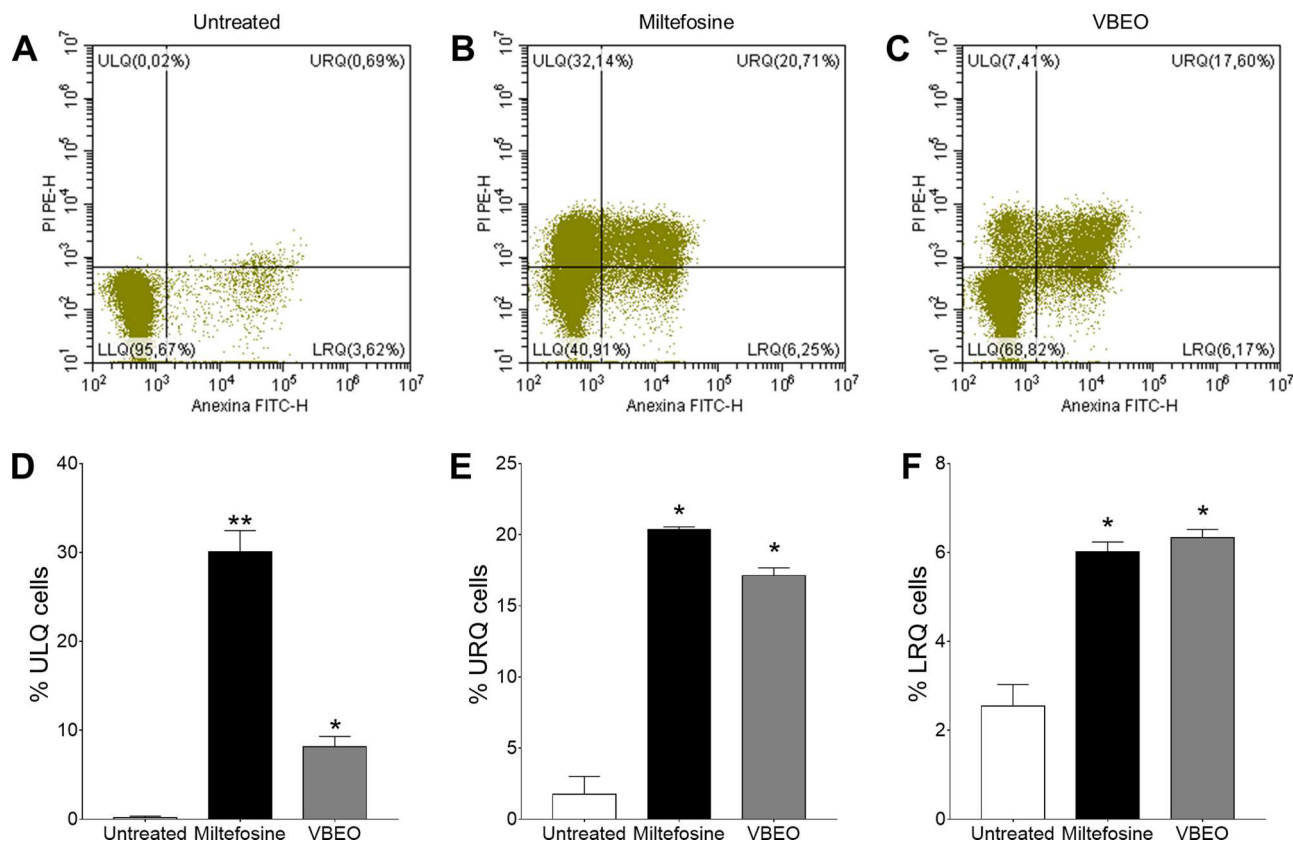


Fig. 7. Changes in phosphatidylserine exposure and plasma membrane integrity in *Leishmania infantum* promastigotes treated with IC_{50} of *Vernonia brasiliensis* essential oil for 72 h. Parasites were labelled with Annexin V-FITC and PI. (A) Untreated promastigotes used as control. (B) Parasites treated with miltefosine, an apoptosis-inducing drug, at a concentration of 50 μ M. (C) Promastigotes treated with *Vernonia brasiliensis* essential oil, at the IC_{50} concentration (39.01 μ g/mL). In D, E and F, statistical differences between the percentage of necrotic, apoptotic and late apoptotic cells, respectively, are shown. In all, the results obtained in the groups treated with the essential oil and miltefosine were statistically different when compared to untreated parasites. (*) $p < 0.05$; (**) $p < 0.01$ when compared to untreated parasites by Mann-Whitney test. ULQ: upper left quadrant; URQ: upper right quadrant; LRQ: low right quadrant.

Table 3

IC_{50} , FIC_{50} and ΣFIC_{50} of *Vernonia brasiliensis* essential oil-miltefosine combination against *Leishmania infantum* promastigotes.

Combination rate		Combined drugs				ΣFIC_{50}	FICI
VBEO	Miltefosine	IC_{50} (μ g/mL)		FIC_{50}			
		VBEO	Miltefosine	VBEO	Miltefosine		
5	0	39.01 \pm 1.080	–	–	–	–	–
4	1	126.7 \pm 1.095	10.56 \pm 1.095	3.247	2.291	5.538	–
3	2	70.87 \pm 1.056	15.75 \pm 1.056	1.816	3.417	5.233	4.779
2	3	36.34 \pm 1.084	18.17 \pm 1.084	0.931	3.943	4.874	–
1	4	11.03 \pm 1.056	14.7 \pm 1.056	0.282	3.190	3.472	–
0	5	–	4.608 \pm 1.110	–	–	–	–

Data expressed as mean \pm SD. VBEO: *Vernonia brasiliensis* essential oil; IC_{50} : inhibitory concentration for 50 % of parasites. FIC_{50} : fractional inhibitory concentrations; ΣFIC_{50} : sum of fractional inhibitory concentrations; FICI: fractional inhibitory concentration index.

been described in the literature as active components of essential oils or plant extracts with leishmanicidal activity [22,38–47], which would be already an indicator of its biological effect.

Regarding the anti-*Leishmania* activity of VBEO, there are few reports in the literature, all with *L. amazonensis*. In the published studies, there was a variation in the IC_{50} values of the essential oil, from 213 μ g/mL after 48 h of treatment [22] to 1.73 μ g/mL at 72 h of treatment [30]. This shows that there are factors that can directly interfere with the biological activity of the oil, such as its chemical composition, the treatment time, the *Leishmania* strain used in the experiments (intrinsic sensitivity of the strain to the drug), among others.

In the light of our knowledge, this is the first description of the effect of VBEO on *L. infantum* promastigotes, which showed that the oil is

active, with an IC_{50} of 39.01 μ g/mL, considered promising for further evaluation. Promastigote forms are widely used in screening tests to search for new drugs, due to the ease of performing the experiments, but it is necessary to evaluate the potential drug action in amastigote forms [48,49]. Our study shows a satisfactory result of the essential oil in promastigote forms of *L. infantum*, and additional tests will confirm whether we are facing a possible leishmanicidal drug.

For cytotoxicity experiments, we used the DH82 cell line and obtained a CC_{50} of 63.13 μ g/mL. As these cells are canine macrophages, they are a model closer to that found in the domestic reservoir. This is the first report of VBEO toxicity in DH82 macrophages. Cytotoxic effects of the essential oil were also evaluated in mice peritoneal macrophages, RAW 264.7 and Vero cells. Vero and RAW 264.7 cells showed CC_{50}

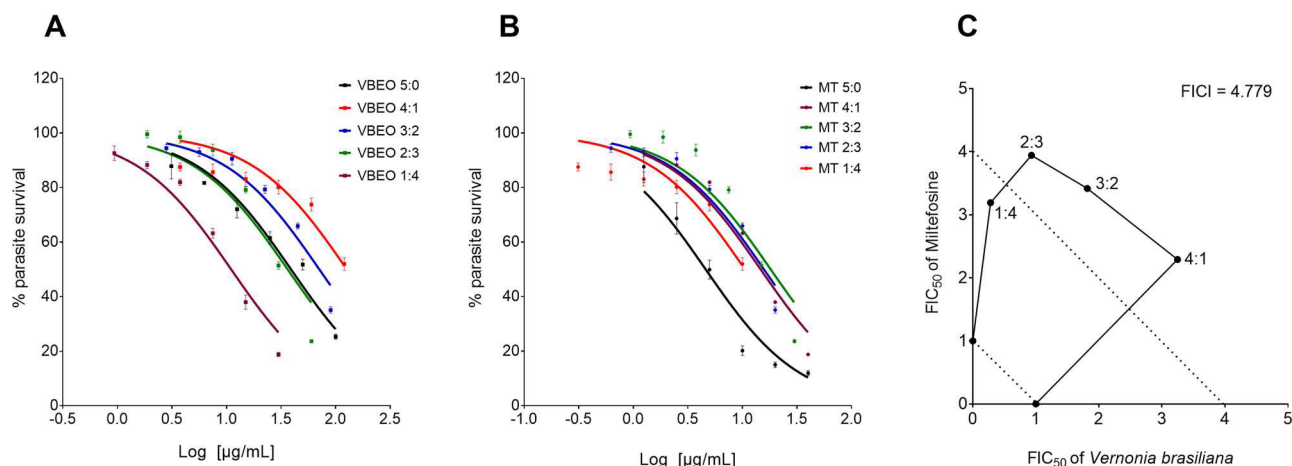


Fig. 8. Antagonistic interaction between *Vernonia brasiliensis* essential oil and miltefosine on *Leishmania infantum* promastigotes. In A and B, the dose-effect curves of different combinations of the essential oil and miltefosine are observed. In C, a representative isobologram of the *in vitro* interactions between the respective drugs. The dotted line corresponds to the predicted positions of the experimental points for a simple additive effect. The points corresponding to the FIC values were connected by a tendency line. VBE0: *Vernonia brasiliensis* essential oil; MT: miltefosine.

values of 151 and 198 $\mu\text{g/mL}$, respectively [22], while peritoneal macrophages were cytotoxic at a concentration of 88.35 $\mu\text{g/mL}$ [30], closer to that obtained in our study. These data allow us to infer that VBE0 is safe for several cell lines.

The antileishmanial activity of the essential oil of *V. brasiliensis* against promastigote forms of *L. infantum* was confirmed by the ultrastructural changes found in the treated parasites. Kinetoplast and mitochondrial swelling are indicators of damage in this organelle and were the most reported structural finding in the literature for *L. infantum* promastigotes, treated with essential oils from *Thymus capitellatus* [50], *Cymbopogon citratus* [51], *Croton cajucara* [52], *Lavandula luisieri* and *L. viridis* [53]. Other cellular alterations found in our study, such as the presence of vesicular formations in the flagellar pocket, disruption of nuclear membrane and nuclear chromatin condensation, resembling the nucleus of apoptotic cells, have also been described for *L. infantum* promastigotes treated with *T. capitellatus* [50], *C. citratus* [51] and *C. cajucara* [52] essential oils.

Transmission electron microscopy showed that VBE0 induced changes in *L. infantum* mitochondria. Usually, these are associated with alteration of mitochondrial membrane potential, as already observed in the literature [38,51]. To confirm mitochondrial dysfunction, the $\Delta\Psi\text{m}$ was evaluated by flow cytometry using TMRE, a positively charged permeable dye that can detect negative charge across a healthy mitochondrion of viable cells [54]. The measurement of the membrane potential of *L. infantum* promastigotes after incubation with VBE0 suggests that the loss of $\Delta\Psi\text{m}$ is involved in its antileishmanial effect.

Some authors have demonstrated similar findings in parasites treated with essential oils. Rottini et al. [38] showed that the essential oil of *Endlicheria bracteolata*, at the concentration of 7.93 $\mu\text{g/mL}$, leads to mitochondrial damage in *L. amazonensis* promastigotes, independently of the treatment time. In experiments conducted by Machado et al. [51], *C. citratus* essential oil (25 $\mu\text{g/mL}$) caused depolarization of mitochondrial membrane potential in promastigotes of *L. infantum*. The same authors evaluated the effect of *T. capitellatus* essential oil (37 $\mu\text{g/mL}$), also against *L. infantum* promastigotes, and observed that it induced a decrease on $\Delta\Psi\text{m}$ [50].

In cells, it is observed that the depolarization of mitochondrial membrane potential is linked to increased levels of ROS, and subsequent cell death [55,56]. Thus, since VBE0 led to mitochondrial membrane depolarization, it is plausible that ROS generation had increased in *L. infantum* promastigotes. Similar observations were made with other essential oils: the eugenol-rich oil of *Syzygium aromaticum* (EROSA) led to a significant increase in ROS levels in promastigotes of *L. donovani*

[57], in the same way as the essential oil from *Artemisia annua* leaves, for the same parasites [58].

Previous studies have demonstrated that oxidative stress is involved in apoptotic-like cell death in *Leishmania* [59,60]. To evaluate cell death induction, parasites treated with VBE0 were double-stained with Annexin-V and PI, and it was observed that the essential oil induced late apoptosis in *L. infantum* promastigotes.

There is still no agreement on the most appropriate terminology to refer to the cell death process in *Leishmania*. According to the review published by Basmaciyan and Casanovas [61], the authors claim that the terms “apoptosis-like cell death” or “programmed cell death” are not correct and that the term “apoptosis” is proper. In contrast, Menna-Barreto [62] says the opposite, that “apoptosis-like cell death” is more suitable. Here we use the terminology found most frequently in the literature.

An apoptosis-like process has been proposed as a cell death mechanism for *Leishmania* parasites [63]. The essential oils from both *A. herba-alba* and *A. campestris* killed *L. infantum* promastigotes by triggering apoptosis, in a dose and time-dependent manner [64]. *C. citratus* essential oil and its major compound citral induce apoptosis in *L. infantum*, at its IC_{50} values (25 and 42 $\mu\text{g/mL}$, respectively) [51]. An increment of the cellular phosphatidylserine externalization, characteristic of apoptosis, was observed in promastigote forms of *L. donovani* treated with the *A. annua* essential oil [58]. Also, in *L. donovani* promastigotes, treatment with EROSA led to a significant percentage of parasites stained positive for both Annexin-V and PI (55.60 %), indicating late apoptotic phase [57], as well as in our study.

Among the compounds identified in VBE0, eight are admittedly apoptosis inducers: β -caryophyllene, caryophyllene oxide, α -humulene, terpinen-4-ol, β -bourbonene, isodene, β -ionone, and δ -cadinene. The apoptotic effect of these isolated substances, as well as their effects on ROS intracellular production and mitochondrial membrane potential, have already been described in the literature for several cell lines, as MG-63 [65,66], OVCAR3 [67,68], HCT116 [69–71], PC-3 [72–74], MCF-7 [72,75], L-929 fibroblasts [75], HL-60 cells [76], and others. There are also reports that caryophyllene oxide induces late apoptosis in *Trypanosoma cruzi* epimastigotes [77], a kinetoplastid as well as *Leishmania infantum*.

As cell death mechanisms are similar in cells and protozoa, the broad description of the apoptotic effects for the isolated compounds was sufficient to base our results and to suggest that the late apoptosis cell death of *L. infantum* promastigotes caused by VBE0 is related to the presence of these active compounds.

To improve the antileishmanial effect of VBEO, the effect of its association with miltefosine, a standard drug for the treatment of visceral leishmaniasis, was evaluated. However, the results obtained showed that the combination had an antagonistic effect.

To date, few studies reported the association between synthetic drugs and natural compounds, or between substances isolated from plants, in the treatment of leishmaniasis. An additive effect between oxiranes and meglumine antimoniate (Glucantime®) against *L. amazonensis* amastigotes were observed by Gonçalves-Oliveira et al. [78], that may lead to an increment of global antileishmanial potential both in vitro and in vivo. When evaluating the effect between combinations of the major compounds of the essential oil of *Chenopodium ambrosioides* (ascaridole, carvacrol, and caryophyllene oxide) against *L. amazonensis* promastigotes, Pastor et al. [79] observed a synergistic effect of ascaridol-carvacrol combination and additive interaction for ascaridol-caryophyllene oxide and carvacrol-caryophyllene oxide. In general, the studies reported additive and synergistic relationship between the tested compounds. Our results, by contrast, showed an antagonistic interaction between a known leishmanicidal drug (miltefosine) and an essential oil with anti-*Leishmania* properties. This is important to emphasize that, even when combining two substances with recognized antiprotozoal activity, the result of the association will not necessarily be the same.

The present work demonstrates that the essential oil from *V. brasiliensis* leaves holds antileishmanial activity against *L. infantum* promastigotes, and it is more toxic to the parasites than to DH82 cells. In contrast, its association with miltefosine did not show the same biological effect. The antiparasitic effect of VBEO was confirmed by the ultrastructural changes, decreased mitochondrial membrane potential, and increased ROS production, which together induced cell death by late apoptosis. Therefore, our overall results strongly suggest VBEO has active molecules that can be explored as sources for new antileishmanial drugs.

Funding

This work was supported by Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, Brazil (CAPES) [Finance Code 001], and by Fundação Carlos Chagas Filho de Amparo à Pesquisa do Estado do Rio de Janeiro – FAPERJ [grant number E-26/010.001759/2019]. The APC was funded by the Instituto Oswaldo Cruz – IOC. Dr. Fernando Almeida-Souza is a postdoctoral researcher fellow of CAPES [grant number 88887.363006/2019-00]. Dra. Ana Lucia Abreu-Silva is a research productivity fellow of National Scientific and Technological Development Council (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPq) [grant number 309885/2017-5].

Declaration of Competing Interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Acknowledgements

The authors thank the Flow Cytometry Core Facility, Oswaldo Cruz Institute, FIOCRUZ, Rio de Janeiro, Brazil for all flow cytometry analyses.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary material related to this article can be found, in the online version, at doi:<https://doi.org/10.1016/j.biopha.2020.111025>.

References

- [1] J. Alvar, S. Yactayo, C. Bern, Leishmaniasis and poverty, *Trends Parasitol.* 22 (2006) 552–557, <https://doi.org/10.1016/j.pt.2006.09.004>.
- [2] J. Martín-Sánchez, J. Rodríguez-Granger, F. Morillas-Márquez, G. Merino-Espinoza, A. Sampedro, L. Aliaga, V. Corpas-López, J. Tercedor-Sánchez, J. Aneiros-Fernández, C. Acedo-Sánchez, L. Porcel-Rodríguez, V. Díaz-Sáez, Leishmaniasis due to *Leishmania infantum*: integration of human, animal and environmental data through a one Health approach, *Transbound. Emerg. Dis.* (2020), <https://doi.org/10.1111/tbed.13580>. Epub ahead of print.
- [3] M.F. Rocha, É.M. Michalsky, F. de Oliveira Lara-Silva, J.L. Valadão, J.C. França-Silva, L.C. Pinheiro, J.F. de Sousa, R.C. Dos Santos, M.D. Soares, C.L. Fortes-Dias, E. S. Dias, Dogs with divergent serology for visceral leishmaniasis as sources of *Leishmania infection for Lutzomyia longipalpis* phlebotomine sand flies - an observational study in an endemic area in Brazil, *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2020 (2020), e0008079, <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008079>.
- [4] R.M. Reguera, M. Morán, Y. Pérez-Pertejo, C. García-Estrada, R. Balaña-Fouce, Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis, *Vet. Parasitol.* 227 (2016) 98–114, <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2016.07.011>.
- [5] P.S. Lage, P.H. de Andrade, A.S. Lopes, M.A. Chávez Fumagalli, D.G. Valadares, M. C. Duarte, D. Pagliara Lage, L.E. Costa, V.T. Martins, T.G. Ribeiro, J.D. Filho, C. A. Tavares, R.M. de Pádua, J.P. Leite, E.A. Coelho, *Strychnos pseudoquina* and its purified compounds present an effective in vitro antileishmanial activity, *Evid. Complement. Alternat. Med.* 2013 (2013), 304354, <https://doi.org/10.1155/2013/304354>.
- [6] R.L. Charlton, B. Rossi-Bergmann, P.W. Denny, P.G. Steel, Repurposing as a strategy for the discovery of new anti-leishmanials: the state-of-the-art, *Parasitology* 145 (2018) 219–236, <https://doi.org/10.1017/S0031182017000993>.
- [7] J.A.L. Lindoso, J.M.L. Costa, I.T. Queiroz, H. Goto, Review of the current treatments for leishmaniasis, *Res. Rep. Trop. Med.* 3 (2012) 69–77, <https://doi.org/10.2147/RRMT.S24764>.
- [8] B.J.M. Da Silva, A.A.P. Hage, E.O. Silva, A.P.D. Rodrigues, Medicinal plants from the Brazilian Amazonian region and their antileishmanial activity: a review, *J. Integr. Med.* 16 (2018) 211–222, <https://doi.org/10.1016/j.joim.2018.04.004>.
- [9] A. Fiseha, M. Tadesse, T. Bekele, B. Bedemo, Phytochemical investigations of *Vernonia galamensis* seeds, *Chem. Nat. Compd.* 46 (2010) 692–695, <https://doi.org/10.1007/s10600-010-9717-z>.
- [10] N.J. Toyang, R. Verpoorte, A review of the medicinal potentials of plants of the genus *Vernonia* (Asteraceae), *J. Ethnopharmacol.* 146 (2013) 681–723, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2013.01.040>.
- [11] L. Kambizi, A.J. Afolayan, An ethnobotanical study of plants used for the treatment of sexually transmitted diseases (njovhera) in Gurube District, Zimbabwe, *J. Ethnopharmacol.* 77 (2001) 5–9, [https://doi.org/10.1016/s0378-8741\(01\)00251-3](https://doi.org/10.1016/s0378-8741(01)00251-3).
- [12] L. Tona, R.K. Cimanga, K. Mesia, C.T. Musumba, T. De Bruyne, S. Apers, N. Hernans, S. Van Miert, L. Pieters, J. Totté, A.J. Vlietinck, In vitro antiparasitological activity of extracts and fractions from seven medicinal plants used in the Democratic Republic of Congo, *J. Ethnopharmacol.* 93 (2004) 27–32, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2004.02.022>.
- [13] N.M. Kimani, J.C. Matasyoh, M. Kaiser, R. Brun, T.J. Schmidt, Anti-trypanosomatid elemanolide sesquiterpene lactones from *Vernonia lasiopus* O. Hoffm, *Molecules* 22 (2017) 597, <https://doi.org/10.3390/molecules22040597>.
- [14] M. Débê, F. Debierre-Grockieo, A. Tété-Bénissan, H. Débare, K. Aklikokou, Dimier-I. Poisson, M. Gbeassor, Extracts of *Tectona grandis* and *Vernonia amygdalina* have anti-Toxoplasma and pro-inflammatory properties in vitro, *Parasite* 25 (2018) 11, <https://doi.org/10.1051/parasite/2018014>.
- [15] A. Ledoux, M. Cao, O. Jansen, L. Mamede, P.E. Campos, B. Payet, P. Clerc, I. Grondin, E. Girard-Valenciennes, T. Herrmann, M. Litaudon, C. Vanderheydt, L. Delang, J. Neyts, P. Leyssen, M. Frédérick, J. Smadja, Antiplasmodial, antichikungunya virus and antioxidant activities of 64 endemic plants from the Mascarene Islands, *Int. J. Antimicrob. Agents* 52 (2018) 622–628, <https://doi.org/10.1016/j.ijantimicag.2018.07.017>.
- [16] T. Bihonegn, M. Giday, G. Yimer, A. Animut, M. Sisay, Antimalarial activity of hydromethanolic extract and its solvent fractions of *Vernonia amygdalina* leaves in mice infected with *Plasmodium berghei*, *SAGE Open Med.* 7 (2019), 2050312119849766, <https://doi.org/10.1177/2050312119849766>.
- [17] F.G. Braga, M.L. Bouzada, R.L. Fabri, M. de O Matos, F.O. Moreira, E. Scio, E. S. Coimbra, Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil, *J. Ethnopharmacol.* 111 (2007) 396–402, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.12.006>.
- [18] J.N. Alawa, K.C. Carter, A.J. Nok, H.O. Kwanashie, S.S. Adebisi, C.B. Alawa, C. J. Clements, Infectivity of macrophages and the histopathology of cutaneous lesions, liver and spleen is attenuated by leaf extract of *Vernonia amygdalina* in *Leishmania major* infected BALB/c mice, *J. Complement. Integr. Med.* 9 (2012), <https://doi.org/10.1515/1553-3840.1617>. Article 10.
- [19] A. Tadesse, A. Gebre-Hiwot, K. Asres, M. Djote, D. Frommel, The in vitro activity of *Vernonia amygdalina* on *Leishmania aethiopicus*, *Ethiop. Med. J.* 31 (1993) 183–189.
- [20] H.A. Oketch-Rabah, E. Lemmich, S.F. Dossaji, T.G. Theander, C.E. Olsen, C. Cornett, A. Kharazmi, S.B. Christensen, Two new antiprotozoal 5-methylcoumarins from *Vernonia brachycalyx*, *J. Nat. Prod.* 60 (1997) 458–461, <https://doi.org/10.1021/np970030o>.
- [21] H.A. Oketch-Rabah, S. Brøgger Christensen, K. Frydenvang, S.F. Dossaji, T. G. Theander, C. Cornett, W.M. Watkins, A. Kharazmi, E. Lemmich, Antiprotozoal properties of 16,17-dihydrobrachycalyxolide from *Vernonia brachycalyx*, *Planta Med.* 64 (1998) 559–562, <https://doi.org/10.1055/s-2006-957514>.
- [22] M.M. Martins, F.J. de Aquino, A. de Oliveira, E.A. do Nascimento, R. Chang, M. S. Borges, G.B. de Melo, C.V. da Silva, F.C. Machado, S.A.L. de Moraes, Chemical composition, antimicrobial and antiprotozoal activity of essential oils from *Vernonia brasiliensis* (less) Druce (Asteraceae), *J. Essent. Oil. Bear. Pl.* 18 (2015) 561–569, <https://doi.org/10.1080/0972060X.2014.895683>.

- [23] R.R.D. Moreira, G.Z. Martins, R. Varandas, J. Cogo, C.H. Perego, G. Roncoli, M.D. C. Sousa, C.V. Nakamura, L. Salgueiro, C. Cavaleiro, Composition and leishmaniacidal activity of the essential oil of *Vernonia polyanthes* less (Asteraceae), *Nat. Prod. Res.* 31 (2017) 2905–2908, <https://doi.org/10.1080/14786419.2017.1299723>.
- [24] E. Rodrigues, Plants of restricted use indicated by three cultures in Brazil (Caboclo-river dweller, Indian and Quilombola), *J. Ethnopharmacol.* 111 (2007) 295–302, <https://doi.org/10.1016/j.jep.2006.11.017>.
- [25] A.I.V. Maia, M.C.M. Torres, O.D.L. Pessoa, J.E.S.A. Menezes, S.M.O. Costa, V.L. R. Nogueira, V.M.M. Melo, E.B. Souza, M.G.B. Cavalcante, M.R.J.R. Albuquerque, Óleos essenciais das folhas de *Vernonia remotiflora* e *Vernonia brasiliana*: composição química e atividade biológica, *Quim. Nova* 33 (2010) 584–586, <https://doi.org/10.1590/S0100-40422010000300018>.
- [26] A. Rojas de Arias, E. Ferro, A. Inchausti, M. Ascurra, N. Acosta, E. Rodriguez, A. Fournet, Mutagenicity, insecticidal and trypanocidal activity of some Paraguayan Asteraceae, *J. Ethnopharmacol.* 45 (1995) 35–41, [https://doi.org/10.1016/0378-8741\(94\)01193-4](https://doi.org/10.1016/0378-8741(94)01193-4).
- [27] T.M. de Almeida Alves, T.J. Nagem, L.H. de Carvalho, A.U. Krettli, C.L. Zani, Antiplasmodial triterpene from *Vernonia brasiliana*, *Planta Med.* 63 (1997) 554–555, <https://doi.org/10.1055/s-2006-957764>.
- [28] L.H. Carvalho, A.U. Krettli, Antimalarial chemotherapy with natural products and chemically defined molecules, *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* 86 (1991) 181–184, <https://doi.org/10.1590/S0074-02761991000600041>.
- [29] L.H. Carvalho, M.G. Brandão, D. Santos-Filho, J.L. Lopes, A.U. Krettli, Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied in vivo in *Plasmodium berghei*-infected mice and in vitro against *Plasmodium falciparum* in culture, *Braz. J. Med. Biol. Res.* 24 (1991) 1113–1123.
- [30] J. Cortez de Sá, Estudo fitoquímico e avaliação da capacidade leishmanicida e cicatrizante cutânea das espécies *Arrabidaea chica* (pariri) e *Vernonia brasiliana* (assa-peixe), Thesis, Federal University of Maranhão, São Luís, 2015.
- [31] M.H.H. Roby, M.A. Sarhan, K.A. Selim, K.I. Khaled, Antioxidant and antimicrobial activities of essential oil and extracts of fennel (*Foeniculum vulgare* L.) and chamomile (*Matricaria chamomilla* L.), *Ind. Crop. Prod.* 44 (2013) 437–445, <https://doi.org/10.1016/j.indcrop.2012.10.012>.
- [32] M.I. Abdelhady, H.A.H. Aly, Antioxidant antimicrobial activities of *Callistemon comboynensis* essential oil, *Free. Radic. Antioxid.* 2 (2012) 37–41, <https://doi.org/10.5530/ax.2012.2.8>.
- [33] T. Mosmann, Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays, *J. Immunol. Methods* 65 (1983) 55–63, [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4).
- [34] F. Almeida-Souza, V.D. da Silva, G.X. Silva, N.N. Taniwaki, D.J. Hardoim, C. D. Buarque, A.L. Abreu-Silva, K.S. Calabrese, 1,4-Disubstituted-1,2,3-Triazole compounds induce ultrastructural alterations in *Leishmania amazonensis* promastigote: an in vitro antileishmanial and in silico pharmacokinetic study, *Int. J. Mol. Sci.* 21 (2020), E6839, <https://doi.org/10.3390/ijms21186839>.
- [35] Q.L. Fivelman, I.S. Adagu, D.C. Warhurst, Modified fixed-ratio isobologram method for studying in vitro interactions between atovaquone and proguanil or dihydroartemisinin against drug-resistant strains of *Plasmodium falciparum*, *Antimicrob. Agents Chemother.* 48 (2004) 4097–4102, <https://doi.org/10.1128/AAC.48.11.4097-4102.2004>.
- [36] F.C. Odds, Synergy, antagonism, and what the checkerboard puts between them, *J. Antimicrob. Chemother.* 52 (2003), <https://doi.org/10.1093/jac/dkg301>, 1–1.
- [37] L. Gobbo-Neto, N.P. Lopes, Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários, *Quim. Nova* 30 (2007) 374–381, <https://doi.org/10.1590/S0100-40422007000200026>.
- [38] M.M. Rottini, A.C.F. Amaral, J.L.P. Ferreira, E.S.C. Oliveira, J.R.A. Silva, N. N. Taniwaki, A.R. Dos Santos, F. Almeida-Souza, C.S.F. de Souza, K.S. Calabrese, *Endlicheria bracteolata* (Meisn.) essential oil as a weapon against *Leishmania amazonensis*: in vitro assay, *Molecules* 24 (2019) 2525, <https://doi.org/10.3390/molecules24142525>.
- [39] P.M. Andrade, D.C. Melo, A. Alcoba, W.G. Ferreira Júnior, M.C. Pagotti, L. G. Magalhães, T. Santos, A. Crotti, C. Alves, M. Miranda, Chemical composition and evaluation of antileishmanial and cytotoxic activities of the essential oil from leaves of *Cryptocarya aschersoniana* Mez. (Lauraceae juss.), *An. Acad. Bras. Ciênc.* 90 (2018) 2671–2678, <https://doi.org/10.1590/0001-3765201820170332>.
- [40] R.R.D. Moreira, A.G. Santos, F.A. Carvalho, C.H. Perego, E.J. Crevelin, A.E. M. Crotti, J. Cogo, M.L.C. Cardoso, C.V. Nakamura, Antileishmanial activity of *Melampodium divaricatum* and *Casearia sylvestris* essential oils on *Leishmania amazonensis*, *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 61 (2019) e33, <https://doi.org/10.1590/s1678-9946201961033>.
- [41] K.A. Rodrigues, L.V. Amorim, J.M. de Oliveira, C.N. Dias, D.F. Moraes, E. H. Andrade, J.G. Maia, S.M. Carneiro, F.A. Carvalho, *Eugenia uniflora* L. essential oil as a potential anti-*Leishmania* agent: effects on *Leishmania amazonensis* and possible mechanisms of action, *Evid. Based Complement. Altern. Med.* 2013 (2013), 279726, <https://doi.org/10.1155/2013/279726>.
- [42] V.P. Ribeiro, C. Arruda, J.A.A. Mejía, A.C.B.B. Candido, R.A. dos Santos, L. G. Magalhães, J.K. Bastos, Brazilian southeast brown propolis: gas chromatography method development for its volatile oil analysis, its antimicrobial and leishmanicidal activities evaluation, *Phytochem. Anal.* 2020 (2020) 1–8, <https://doi.org/10.1002/pca.2988>.
- [43] R.R.P. Machado, W. Valente Júnior, B. Lesche, E.S. Coimbra, N.B. de Souza, C. Abramo, G.L.G. Soares, M.A.C. Kaplan, Essential oil from leaves of *Lantana camara*: a potential source of medicine against leishmaniasis, *Rev. Bras. Farmacogn.* 22 (2012) 1011–1017, <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2012005000057>.
- [44] C.A.T. Siqueira, J. Oliani, A. Sartoratto, C.L. Queiroga, P.R.H. Moreno, J. Q. Reimão, A.G. Tempone, D.C.H. Fischer, Chemical constituents of the volatile oil from leaves of *Annona coriacea* and in vitro antiprotozoal activity, *Rev. Bras. Farmacogn.* 21 (2011) 33–40, <https://doi.org/10.1590/S0102-695X2011005000004>.
- [45] R. Delgado-Altamirano, R.I. López-Palma, L. Monzote, J. Delgado-Domínguez, I. Becker, J.F. Rivero-Cruz, N. Esturau-Escofet, P.A. Vázquez-Landaverde, A. Rojas-Molina, Chemical constituents with leishmanicidal activity from a pink-yellow cultivar of *Lantana camara* var. *Aculeata* (L.) collected in Central Mexico, *Int. J. Mol. Sci.* 20 (2019) 872, <https://doi.org/10.3390/ijms20040872>.
- [46] L. Bosquiroli, A.C. dos Santos Ferreira, K.S. Farias, E.C. da Costa, M. Matos, M. Kadri, Y.S. Rizk, F.M. Alves, R.T. Perdomo, C.A. Carollo, C.C. Pinto de Arruda, In vitro antileishmania activity of sesquiterpene-rich essential oils from *Nectandra* species, *Pharm. Biol.* 55 (2017) 2285–2291, <https://doi.org/10.1080/13880209.2017.1407803>.
- [47] L.S.S. Bosquiroli, D.P. Demarque, Y.S. Rizk, M.C. Cunha, M.C.S. Marques, M.F. C. Matos, M.C.T. Kadri, C.A. Carollo, C.C.P. Arruda, In vitro anti-*Leishmania* infantum activity of essential oil from *Piper angustifolium*, *Rev. Bras. Farmacogn.* 25 (2015) 124–128, <https://doi.org/10.1016/j.bjp.2015.03.008>.
- [48] F. Almeida-Souza, Cda S. de Souza, N.N. Taniwaki, J.J. Silva, R.M. de Oliveira, A. L. Abreu-Silva, K. Calabrese, *Morinda citrifolia* Linn. fruit (Noni) juice induces an increase in NO production and death of *Leishmania amazonensis* amastigotes in peritoneal macrophages from BALB/c, *Nitric Oxide* 58 (2016) 51–58, <https://doi.org/10.1016/j.niox.2016.06.004>.
- [49] S. Cortes, C. Bruno de Sousa, T. Morais, J. Lago, L. Campino, Potential of the natural products against leishmaniasis in Old World - a review of in-vitro studies, *Pathog. Glob. Health* 114 (2020) 170–182, <https://doi.org/10.1080/20477724.2020.1754655>.
- [50] M. Machado, A.M. Dinis, M. Santos-Rosa, V. Alves, L. Salgueiro, C. Cavaleiro, M. C. Sousa, Activity of *Thymus capitellatus* volatile extract, 1,8-cineole and borneol against *Leishmania* species, *Vet. Parasitol.* 200 (2014) 39–49, <https://doi.org/10.1016/j.vetpar.2013.11.016>.
- [51] M. Machado, P. Pires, A.M. Dinis, M. Santos-Rosa, V. Alves, L. Salgueiro, C. Cavaleiro, M.C. Sousa, Monoterpenic aldehydes as potential anti-*Leishmania* agents: activity of *Cymbopogon citratus* and citral on *L. infantum*, *L. tropica* and *L. major*, *Exp. Parasitol.* 130 (2012) 223–231, <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2011.12.012>.
- [52] I.A. Rodrigues, M.M. Azevedo, F.C. Chaves, H.R. Bizzo, S. Corte-Real, D.S. Alviano, C.S. Alviano, M.S. Rosa, A.B. Vermelho, In vitro cytotoxic effects of the essential oil from *Croton cajucara* (red sacaca) and its major constituent 7-hydroxycalamene against *Leishmania chagasi*, *BMC Complement. Altern. Med.* 13 (2013) 249, <https://doi.org/10.1186/1472-6882-13-249>.
- [53] M. Machado, N. Martins, L. Salgueiro, C. Cavaleiro, M.C. Sousa, *Lavandula luisieri* and *Lavandula viridis* essential oils as upcoming anti-protozoal agents: a key focus on leishmaniasis, *Appl. Sci.* 9 (2019) 3056, <https://doi.org/10.3390/app9153056>.
- [54] L.C. Crowley, M.E. Christensen, N.J. Waterhouse, Measuring mitochondrial transmembrane potential by TMRE staining, *Cold Spring Harb. Protoc.* 12 (2016) 10, <https://doi.org/10.1101/pdb.prot087361>.
- [55] K. Banki, E. Hutter, N.J. Gonchoroff, A. Perl, Elevation of mitochondrial transmembrane potential and reactive oxygen intermediate levels are early events and occur independently from activation of caspases in Fas signaling, *J. Immunol.* 162 (1999) 1466–1479.
- [56] T.M. Johnson, Z.X. Yu, V.J. Ferrans, R.A. Lowenstein, T. Finkel, Reactive oxygen species are downstream mediators of p53-dependent apoptosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A.* 93 (1996) 11848–11852, <https://doi.org/10.1073/pnas.93.21.11848>.
- [57] M. Islamuddin, D. Sahal, F. Afrin, Apoptosis-like death in *Leishmania donovani* promastigotes induced by eugenol-rich oil of *Syzygium aromaticum*, *J. Med. Microbiol.* 63 (2014) 74–85, <https://doi.org/10.1099/jmm.0.064709-0>.
- [58] M. Islamuddin, G. Chouhan, M. Tyagi, M.Z. Abdin, D. Sahal, F. Afrin, Leishmanicidal activities of *Artemisia annua* leaf essential oil against Visceral Leishmaniasis, *Front. Microbiol.* 5 (2014) 626, <https://doi.org/10.3389/fmicb.2014.00626>.
- [59] S. Dey, D. Mukherjee, S. Chakraborty, S. Mallick, A. Dutta, J. Ghosh, N. Swapana, S. Maiti, N. Ghorai, C.B. Singh, C. Pal, Protective effect of *Croton caudatus* Geisel leaf extract against experimental visceral leishmaniasis induces proinflammatory cytokines in vitro and in vivo, *Exp. Parasitol.* 151–152 (2015) 84–95, <https://doi.org/10.1016/j.exppara.2015.01.012>.
- [60] S. Mallick, S. Dey, S. Mandal, A. Dutta, D. Mukherjee, G. Biswas, S. Chatterjee, S. Mallick, T.K. Lai, K. Acharya, C. Pal, A novel triterpene from *Astragalus hygrometricus* induces reactive oxygen species leading to death in *Leishmania donovani*, *Future Microbiol.* 10 (2015) 763–789, <https://doi.org/10.2217/fmb.14.149>.
- [61] L. Basmacıyan, M. Casanova, Cell death in *Leishmania*, *Parasite* 26 (2019) 71, <https://doi.org/10.1051/parasite/2019071>.
- [62] R.F.S. Menna-Barreto, Cell death pathways in pathogenic trypanosomatids: lessons of (over)kill, *Cell Death Dis.* 10 (2019) 93, <https://doi.org/10.1038/s41419-019-1370-2>.
- [63] L.F. Ceole, M. Cardoso, M.J. Soares, Nerolidol, the main constituent of *Piper aduncum* essential oil, has anti-*Leishmania braziliensis* activity, *Parasitology* 144 (2017) 1179–1190, <https://doi.org/10.1017/S0031182017000452>.
- [64] Z. Aloui, C. Messaoud, M. Haoues, N. Nefati, I. Bassoumi Jamoussi, K. Essafi-Benkhadir, M. Boussaid, I. Guizani, H. Karoui, Asteraceae *Artemisia campestris* and *Artemisia herba-alba* essential oils trigger apoptosis and cell cycle arrest in *Leishmania infantum* promastigotes, *Evid. Complement. Alternat. Med.* 2016 (2016), 9147096, <https://doi.org/10.1155/2016/9147096>.

- [65] Z. Pan, S.K. Wang, X.L. Cheng, X.W. Tian, J. Wang, Caryophyllene oxide exhibits anti-cancer effects in MG-63 human osteosarcoma cells via the inhibition of cell migration, generation of reactive oxygen species and induction of apoptosis, *Bangladesh J. Pharmacol.* 11 (2016) 817–823, <https://doi.org/10.3329/bjpv.1114.27517>.
- [66] V. Annamalai, M. Kotakonda, V. Periyannan, JAK1/STAT3 regulatory effect of β -caryophyllene on MG-63 osteosarcoma cells via ROS-induced apoptotic mitochondrial pathway by DNA fragmentation, *J. Biochem. Mol. Toxicol.* 34 (2020), e22514, <https://doi.org/10.1002/jbt.22514>.
- [67] L.M. Hui, G.D. Zhao, J.J. Zhao, δ -Cadinene inhibits the growth of ovarian cancer cells via caspase-dependent apoptosis and cell cycle arrest, *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 8 (2015) 6046–6056.
- [68] S. Arul, H. Rajagopalan, J. Ravi, H. Dayalan, Beta-caryophyllene suppresses ovarian cancer proliferation by inducing cell cycle arrest and apoptosis, *Anticancer Agents Med. Chem.* 20 (2020) 1530–1537, <https://doi.org/10.2174/1871520620666200227093216>.
- [69] S.S. Dahham, Y.M. Tabana, M.A. Iqbal, M.B. Ahamed, M.O. Ezzat, A.S. Majid, A. M. Majid, The anticancer, antioxidant and antimicrobial properties of the sesquiterpene β -caryophyllene from the essential oil of *Aquilaria crassna*, *Molecules* 20 (2015) 11808–11829, <https://doi.org/10.3390/molecules200711808>.
- [70] M. Asif, A. Shafaei, S.F. Jafari, S.K. Mohamed, M.O. Ezzat, A.S. Abdul Majid, C. E. Oon, S.H. Petersen, K. Kono, A.M. Abdul Majid, Isoledene from *Mesua ferrea* oleo-gum resin induces apoptosis in HCT 116 cells through ROS-mediated modulation of multiple proteins in the apoptotic pathways: a mechanistic study, *Toxicol. Lett.* 22 (2016) 84–96, <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2016.05.027>.
- [71] K. Nakayama, S. Murata, H. Ito, K. Iwasaki, M.O. Villareal, Y.W. Zheng, H. Matsui, H. Isoda, N. Ohkohchi, Terpinen-4-ol inhibits colorectal cancer growth via reactive oxygen species, *Oncol. Lett.* 14 (2017) 2015–2024, <https://doi.org/10.3892/ol.2017.6370>.
- [72] K.R. Park, D. Nam, H.M. Yun, S.G. Lee, H.J. Jang, G. Sethi, S.K. Cho, K.S. Ahn, β -Caryophyllene oxide inhibits growth and induces apoptosis through the suppression of PI3K/AKT/mTOR/S6K1 pathways and ROS-mediated MAPKs activation, *Cancer Lett.* 312 (2011) 178–188, <https://doi.org/10.1016/j.canlet.2011.08.001>.
- [73] S. Jones, N.V. Fernandes, H. Yeganehjoo, R. Katuru, H. Qu, Z. Yu, H. Mo, β -ionone induces cell cycle arrest and apoptosis in human prostate tumor cells, *Nutr. Cancer* 65 (2013) 600–610, <https://doi.org/10.1080/01635581.2013.776091>.
- [74] Z. Wang, F. Liu, J.J. Yu, J.Z. Jin, β -Bourbonene attenuates proliferation and induces apoptosis of prostate cancer cells, *Oncol. Lett.* 16 (2018) 4519–4525, <https://doi.org/10.3892/ol.2018.9183>.
- [75] J. Legault, W. Dahl, E. Debiton, A. Pichette, J.C. Madelmont, Antitumor activity of balsam fir oil: production of reactive oxygen species induced by alpha-humulene as possible mechanism of action, *Planta Med.* 69 (2003) 402–407, <https://doi.org/10.1055/s-2003-39695>.
- [76] R. Banjerpongchai, P. Khaw-On, Terpinen-4-ol induces autophagic and apoptotic cell death in human leukemic HL-60 cells, *Asian Pac. J. Cancer Prev.* 14 (2013) 7537–7542, <https://doi.org/10.7314/apjcp.2013.14.12.7537>.
- [77] É.M. Moreno, S.M. Leal, E.E. Stashenko, L.T. García, Induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* by *Lippia alba* essential oils and their major and synergistic terpenes (citral, limonene and caryophyllene oxide), *BMC Complement. Altern. Med.* 18 (2018) 225, <https://doi.org/10.1186/s12906-018-2293-7>.
- [78] L.F. Gonçalves-Oliveira, F. Souza-Silva, L.M. de Castro Côrtes, L.B. Veloso, B. A. Santini Pereira, L. Cysne-Finkelstein, G.C. Lechuga, S.C. Bourguignon, F. Almeida-Souza, K. da Silva Calabrese, V.F. Ferreira, C.R. Alves, The combination therapy of meglumine antimoniate and oxiranes (epoxy- α -lapachone and epoxymethyl-lawsone) enhance the leishmanicidal effect in mice infected by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, *Int. J. Parasitol. Drugs Drug Resist.* 10 (2019) 101–108, <https://doi.org/10.1016/j.ijpddr.2019.08.002>.
- [79] J. Pastor, M. García, S. Steinbauer, W.N. Setzer, R. Scull, L. Gille, L. Monzote, Combinations of ascaridole, carvacrol, and caryophyllene oxide against *Leishmania*, *Acta Trop.* 145 (2015) 31–38, <https://doi.org/10.1016/j.actatropica.2015.02.002>.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- Os compostos químicos presentes no óleo essencial das folhas de *V. brasiliiana* são predominantemente sesquiterpenos;
- O óleo essencial de *V. brasiliiana* apresenta atividade leishmanicida em promastigotas de *L. infantum*;
- O óleo essencial apresenta efeito citotóxico em macrófagos da linhagem DH82;
- O óleo essencial de *V. brasiliiana* induz alterações ultraestruturais em promastigotas de *L. infantum*;
- O óleo essencial de *V. brasiliiana* promove alteração no potencial de membrana mitocondrial e leva ao aumento da produção de espécies reativas de oxigênio em *L. infantum*;
- O óleo essencial de *V. brasiliiana* induz à morte celular por apoptose tardia em formas promastigotas de *L. infantum*;
- O uso associado do óleo essencial e da miltefosina apresentou efeito antagônico em promastigotas de *L. infantum*.

REFERÊNCIAS

- ACHUBA, F. I. **Role of bitter leaf (*Vernonia amygdalina*) extract in prevention of renal toxicity induced by crude petroleum contaminated diets in rats.** International Journal of Veterinary Science and Medicine, v. 6, p. 172-177, 2018. DOI:10.1016/j.ijvsm.2018.07.002.
- ADEDIRAN, O. A.; UWALAKA, E. C. **Effectiveness evaluation of levamisole, albendazole, ivermectin, and *Vernonia amygdalina* in West African dwarf goats.** Journal of Parasitology Research, v. 2015, 2015. DOI:10.1155/2015/706824.
- ADEFISAYO, M. A. *et al.* **Gastro-protective effect of methanol extract of *Vernonia amygdalina* (del.) leaf on aspirin-induced gastric ulcer in Wistar rats.** Toxicology Reports, v. 4, p. 625-633, 2017. DOI:10.1016/j.toxrep.2017.11.004.
- ADEFISAYO, M. A. *et al.* **Protective effects of methanol extract of *Vernonia amygdalina* (del.) leaf on aspirin-induced gastric ulceration and oxidative mucosal damage in a rat model of gastric injury.** Dose-Response, v. 16, 2018. DOI:10.1177/1559325818785087.
- ADEPAPO, A. A. *et al.* **Anti-oxidant, anti-inflammatory and antinociceptive properties of the acetone leaf extract of *Vernonia amygdalina* in some laboratory animals.** Advanced Pharmaceutical Bulletin, v. 4, p. 591-598, 2014. DOI:10.5681/apb.2014.087.
- AGA, E. *et al.* **Inhibition of the spontaneous apoptosis of neutrophil granulocytes by the intracellular parasite *Leishmania major*.** Journal of Immunology, v. 169, p. 898-905, 2002. DOI:10.4049/jimmunol.169.2.898.
- ALAWA, J. N. *et al.* **Infectivity of macrophages and the histopathology of cutaneous lesions, liver and spleen is attenuated by leaf extract of *Vernonia amygdalina* in *Leishmania major* infected BALB/c mice.** Journal of Complementary and Integrative Medicine, v. 9, 2012. DOI:10.1515/1553-3840.1617.
- ALI, H. Z. *et al.* **Endocytosis and sphingolipid scavenging in *Leishmania mexicana* amastigotes.** Biochemistry Research International, v. 2012, 2012. DOI:10.1155/2012/691363.
- ALLOS, H. *et al.* **Regulatory T cells for more targeted immunosuppressive therapies.** Clinics in Laboratory Medicine, v. 39, pp. 1-13, 2019. DOI:10.1016/j.cll.2018.11.001.
- ALVAR, J. *et al.* **Leishmaniasis and poverty.** Trends in Parasitology, v. 22, p. 552-557, 2006. DOI:10.1016/j.pt.2006.09.004.
- ALVAR, J. *et al.* **Leishmaniasis worldwide and global estimates of its incidence.** PLoS One, v. 7, e35671, 2012. DOI:10.1371/journal.pone.0035671.
- ALVES, T. M. *et al.* **Antiplasmodial triterpene from *Vernonia brasiliiana*.** Planta Medica, v. 63, p. 554-555, 1997. DOI:10.1055/s-2006-957764.
- ALVES, W. A.; BEVILACQUA, P. D. **Quality of diagnosis of canine visceral Leishmaniasis in epidemiological surveys: an epidemic in Belo Horizonte, Minas**

Gerais, Brazil, 1993-1997. Cadernos de Saúde Pública, v. 20, p. 259-265, 2004. DOI:10.1590/S0102-311X2004000100043.

ANDRADE, H. M. *et al.* **Evaluation of miltefosine for the treatment of dogs naturally infected with *L. infantum* (= *L. chagasi*) in Brazil.** Veterinary Parasitology, v. 181, p. 83-90, 2011. DOI:10.1016/j.vetpar.2011.05.009.

ANDRADE, M. A. *et al.* **Essential oils: in vitro activity against *Leishmania amazonensis*, cytotoxicity and chemical composition.** BMC Complementary and Alternative Medicine, v. 16, 2016. DOI:10.1186/s12906-016-1401-9.

ANVISA. Agência Nacional de Vigilância Sanitária. **Medicamentos fitoterápicos e plantas medicinais.** 2019. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/fitoterapicos>. Acesso em: 16 dez. 2019.

AOBULI, A. *et al.* **The effect of volatile oil from *Vernonia anthelmintica* seeds on melanin synthesis in B16 cells and its chemical analysis by GC-QTOF-MS.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, 2018, 2018. DOI:10.1155/2018/6291281.

APPADATH BEERAN, A. *et al.* **The enriched fraction of *Vernonia cinerea* L. induces apoptosis and inhibits multi-drug resistance transporters in human epithelial cancer cells.** Journal of Ethnopharmacology, v. 158, p. 33-42, 2014. DOI:10.1016/j.jep.2014.10.010.

ASANTE, D. B. *et al.* **Anti-inflammatory, anti-nociceptive and antipyretic activity of young and old leaves of *Vernonia amygdalina*.** Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 111, p. 1187-1203, 2019. DOI:10.1016/j.biopha.2018.12.147.

AZZOUZ, S.; LAWTON, P. **In vitro effects of purine and pyrimidine analogues on *Leishmania donovani* and *Leishmania infantum* promastigotes and intracellular amastigotes.** Acta Parasitologica, v. 62, p. 582-588, 2017. DOI:10.1515/ap-2017-0070.

BAKKALI, F. *et al.* **Biological effects of essential oils – A review.** Food and Chemical Toxicology, v. 46, p. 446-475, 2008. DOI:10.1016/j.fct.2007.09.106.

BALANÑA-FOUCE, R. *et al.* **Indotecan (LMP400) and AM13-55: two novel indenoisoquinolines show potential for treating visceral leishmaniasis.** Antimicrobial Agents and Chemotherapy, v. 56, p. 5264-5270, 2012. DOI:10.1128/AAC.00499-12.

BANETH, G. *et al.* **Canine leishmaniasis—new concepts and insights on an expanding zoonosis: part one.** Trends in Parasitology, v. 24, p. 324-330, 2008. DOI:10.1016/j.pt.2008.04.001.

BANETH, G.; AROCH, I. **Canine leishmaniasis: A diagnostic and clinical challenge.** The Veterinary Journal, v. 175, p. 14-15, 2008. DOI:10.1016/j.tvjl.2006.11.011.

BARNES, P. *et al.* **Ameliorative effect of *Vernonia amygdalina* plant extract on heavy metal-induced liver and kidney dysfunction in rats.** Advances in Pharmacological and Pharmaceutical Sciences, v. 2020, 2020. DOI:10.1155/2020/2976905.

BARROS, J. *et al.* **Role of bifunctional ammonia-lyase in grass cell wall biosynthesis.** *Nature Plants*, v. 2, 2016. DOI:10.1038/nplants.2016.50.

BELO, V. S. *et al.* **Population estimation methods for free-ranging dogs: a systematic review.** *PLoS One*, v. 10, 2015. DOI:10.1371/journal.pone.0144830.

BERMAN, J. D. **Miltefosine to treat leishmaniasis.** *Expert Opinion on Pharmacotherapy*, v. 6, p. 1381-1388, 2005. DOI:10.1517/14656566.6.8.1381.

BHATTACHARYA, P. *et al.* **Arabinosylated lipoarabinomannan-mediated protection in visceral leishmaniasis through upregulation of toll-like receptor 2 signaling: an immunoprophylactic approach.** *Journal of Infectious Diseases*, v. 202, p. 145-155, 2010. DOI:10.1086/653210.

BIANCIARDI, P. *et al.* **Administration of miltefosine and meglumine antimoniate in healthy dogs: clinicopathological evaluation of the impact on the kidneys.** *Toxicologic Pathology*, v. 37, p. 770-775, 2009. DOI:10.1177/0192623309344088.

BIFELD, E.; CLOS, J. **The genetics of *Leishmania* virulence.** *Medical Microbiology and Immunology*, v. 204, p. 619-634, 2015. DOI:10.1007/s00430-015-0422-1.

BIHONEGN, T. *et al.* **Antimalarial activity of hydromethanolic extract and its solvent fractions of *Vernonia amygdalina* leaves in mice infected with *Plasmodium berghei*.** *SAGE Open Medicine*, v. 7, 2019. DOI:10.1177/2050312119849766.

BLAVIER, A. *et al.* **Atypical forms of canine leishmaniosis.** *Veterinary Journal*, v. 162, p. 108-120, 2001. DOI:10.1053/tvjl.2000.0556.

BOEING, T. *et al.* **Antiulcer mechanisms of *Vernonia condensata* Baker: A medicinal plant used in the treatment of gastritis and gastric ulcer.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 184, p. 196-207, 2016. DOI:10.1016/j.jep.2016.02.049.

BOYOM, F. F. *et al.* **Composition and anti-plasmodial activities of essential oils from some Cameroonian medicinal plants.** *Phytochemistry*, v. 64, p. 1269-1275, 2003. DOI:10.1016/j.phytochem.2003.08.004.

BRAGA, F. G. *et al.* **Antileishmanial and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 111, p. 396-402, 2007. DOI:10.1016/j.jep.2006.12.006.

BRASIL. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Nota técnica nº 11/2016/CPV/DFIP/SDA/GM/MAPA, de 01 de setembro de 2016. **Autoriza o registro do produto MILTEFORAN, sob número SP 000175-9.000003, de propriedade da empresa VIRBAC SAÚDE ANIMAL, indicado para o tratamento da leishmaniose visceral de cães.** Brasília, DF, 01 set 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Ministério da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. Portaria interministerial nº 1.426, de 11 de julho de 2008. **Proíbe o tratamento de leishmaniose visceral canina com produtos de uso humano ou não registrados no Ministério**

da Agricultura, Pecuária e Abastecimento. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, nº 133, p. 37, 14 jul 2008a.

BRASIL. Ministério da Saúde. **MS elabora Relação de Plantas Medicinais de Interesse ao SUS**. 2009. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/sus/pdf/marco/ms_relacao_plantas_medicinais_sus_0603.pdf. Acesso em: 11 set. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portaria Interministerial nº 2.960, de 9 de dezembro de 2008. Aprova o Programa Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos e cria o Comitê Nacional de Plantas Medicinais e Fitoterápicos. **Diário Oficial da União**: seção 1, Brasília, DF, nº 240, p. 56, 10 dez 2008b.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 2006. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscer_al.pdf. Acesso em: 19 ago. 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de vigilância e controle da leishmaniose visceral. 2014. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_vigilancia_controle_leishmaniose_viscer_al_1edicao.pdf. Acesso em: 20 ago. 2019.

BRINKHOFF, A. *et al.* **Pro-inflammatory Th1 and Th17 cells are suppressed during human experimental endotoxemia whereas anti-inflammatory IL-10 producing T-cells are unaffected**. *Frontiers in Immunology*, v. 9, 2018. DOI:10.3389/fimmu.2018.01133.

BRINKMANN, V. *et al.* **Neutrophil extracellular traps kill bacteria**. *Science*, v. 303, p. 1532-1535, 2004. DOI:10.1126/science.1092385.

BRITTINGHAM, A. *et al.* **Role of the *Leishmania* surface protease gp63 in complement fixation, cell adhesion, and resistance to complement-mediated lysis**. *Journal of Immunology*, v. 155, p. 3102-3111, 1995.

CALLA-MAGARINOS, J. *et al.* **An alkaloid extract of evanta, traditionally used as anti-*Leishmania* agent in Bolivia, inhibits cellular proliferation and interferon-gamma production in polyclonally activated cells**. *Scandinavian Journal of Immunology*, v. 69, p. 251-258, 2009. DOI:10.1111/j.1365-3083.2008.02219.x.

CARVALHO, L. H. *et al.* **Antimalarial activity of crude extracts from Brazilian plants studied in vivo in *Plasmodium berghei*-infected mice and in vitro against *Plasmodium falciparum* in culture**. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*, v. 24, p. 1113-1123, 1991.

CARVALHO, L. H.; KRETTLI, A. U. **Antimalarial chemotherapy with natural products and chemically defined molecules**. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 86, p. 181-184, 1991. DOI:10.1590/s0074-02761991000600041.

CECÍLIO, P. *et al.* **Deception and manipulation: The arms of *Leishmania*, a successful parasite**. *Frontiers in Immunology*, v. 5, 2014. DOI:10.3389/fimmu.2014.00480.

CH'NG, Y. S. *et al.* **Vasorelaxant properties of *Vernonia amygdalina* ethanol extract and its possible mechanism.** *Pharmaceutical Biology*, v. 55, p. 2083-2094, 2017. DOI:10.1080/13880209.2017.1357735.

CHUKWUEMEKA, N. O. *et al.* **Antibacterial assay and reversion of carbon tetrachloride induced liver damage on Wistar mice by *Vernonia amygdalina*.** *Delile. Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences*, v. 31, p.1311-1321, 2018.

CIARAMELLA, P. *et al.* **A retrospective clinical study of canine leishmaniasis in 150 dogs naturally infected by *Leishmania infantum*.** *Veterinary Record*, v. 141, p. 539-543, 1997. DOI:10.1136/vr.141.21.539.

COLARES, A. V. *et al.* **In vitro antileishmanial activity of essential oil of *Vanillosmopsis arborea* (Asteraceae) Baker.** *Evidence Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2013, 2013. DOI:10.1155/2013/727042.

CORONA, M. *et al.* **Haemostatic disorders in dogs naturally infected by *Leishmania infantum*.** *Veterinary Research Communications*, v. 28, v. 331-334, 2004. DOI:10.1023/b:verc.0000045439.46994.1f.

CORRÊA, R. M. *et al.* **Rendimento de óleo essencial e caracterização organoléptica de folhas de assa-peixe submetidas a diferentes tipos de secagem.** *Ciência e Agrotecnologia*, v. 28, p. 339-344, 2004. DOI:10.1590/S1413-70542004000200013.

CORTADELLAS, O. *et al.* **Systemic hypertension in dogs with leishmaniasis: prevalence and clinical consequences.** *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 20, p. 941-947, 2006. DOI:10.1892/0891-6640(2006)20[941:shidw]2.0.co;2.

CORTEZ DE SÁ, J. **Estudo fitoquímico e avaliação da capacidade leishmanicida e cicatrizante cutânea das espécies *Arrabidaea chica* (pariri) e *Vernonia brasiliiana* (assa-peixe).** 2015. 182 f. Tese (Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Rede Nordeste de Biotecnologia) - Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2015.

COSTA, D. N. *et al.* **Culling dogs in scenarios of imperfect control: realistic impact on the prevalence of canine visceral leishmaniasis.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 7, 2013. DOI:10.1371/journal.pntd.0002355.

COURTENAY, O. *et al.* **Heterogeneities in *Leishmania infantum* infection: using skin parasite burdens to identify highly infectious dogs.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, 2014. DOI:10.1371/journal.pntd.0002583.

COURTENAY, O. *et al.* **Infectiousness in a cohort of Brazilian dogs: why culling fails to control visceral leishmaniasis in areas of high transmission.** *The Journal of Infectious Diseases*, v. 186, p. 1314-1320, 2002. DOI:10.1086/344312.

CRAFT, J. D. *et al.* **The chemotaxonomy of common sage (*Salvia officinalis*) based on the volatile constituents.** *Medicines*, v. 4, 2017. DOI:10.3390/medicines4030047.

CRAGG, G. M. *et al.* **Impact of natural products on developing new anti-cancer agents.** Chemical Reviews, v. 109, p. 3012-3043, 2009. DOI:10.1021/cr900019j.

CROME, S. Q. *et al.* **Translational mini-review series on Th17 cells: function and regulation of human T helper 17 cells in health and disease.** Clinical & Experimental Immunology, v. 159, p. 109-119, 2010. DOI:10.1111/j.1365-2249.2009.04037.x.

DA SILVA, B. J. M. *et al.* **Medicinal plants from the Brazilian Amazonian region and their antileishmanial activity: a review.** Journal of Integrative Medicine, v. 16, p. 211-222, 2018a. DOI:10.1016/j.joim.2018.04.004.

DA SILVA, J. B. *et al.* **A promising antibiotic, synergistic and antibiofilm effects of *Vernonia condensata* Baker (Asteraceae) on *Staphylococcus aureus*.** Microbial Pathogenesis, v. 123, p. 385-392, 2018b. DOI:10.1016/j.micpath.2018.07.031.

DANTAS-TORRES, F. *et al.* **Canine leishmaniosis in the Old and New Worlds: unveiled similarities and differences.** Trends in Parasitology, v. 28, p. 531-538, 2012. DOI:10.1016/j.pt.2012.08.007.

DAS, S. *et al.* **TGF- β (1) re-programs TLR4 signaling in *L. donovani* infection: enhancement of SHP-1 and ubiquitin-editing enzyme A20.** Immunology and Cell Biology, v. 90, p. 640-654, 2012. DOI:10.1038/icb.2011.80.

DE VEER, M. J. *et al.* **MyD88 is essential for clearance of *Leishmania major*: possible role for lipophosphoglycan and toll-like receptor 2 signaling.** European Journal of Immunology, v. 33, p. 2822-2831, 2003. DOI:10.1002/eji.200324128.

DÉGBÉ, M. *et al.* **Extracts of *Tectona grandis* and *Vernonia amygdalina* have anti-Toxoplasma and pro-inflammatory properties in vitro.** Parasite, v. 25, 2018. DOI:10.1051/parasite/2018014.

DEGU, A. *et al.* **Evaluation of the antidiarrheal activity of hydromethanol crude extracts of *Ruta chalepensis* and *Vernonia amygdalina* in mice.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2020, 2020. DOI:10.1155/2020/8318713.

DEMATTEIS, M.; FERNANDEZ, A. **Karyotypes of seven South American species of *Vernonia* (Asteraceae).** Cytologia, v. 63, p. 323-328, 1998.

DENG, Y.; LU, S. **Biosynthesis and regulation of phenylpropanoids in plants.** Critical Reviews in Plant Sciences, v. 36, p. 257-290, 2017. DOI:10.1080/07352689.2017.1402852.

DEWICK P. M. **The biosynthesis of C5-C25 terpenoid compounds.** Natural Product Reports, v. 14, p. 111-144, 1997. DOI:10.1039/np9971400111.

DNDi. Drugs for Neglected Diseases Initiative. **Rumo a uma nova geração de tratamentos para as leishmanioses.** 2019. Disponível em: https://dndi.org/wp-content/uploads/2019/09/DNDi_Leishmaniasis_2019_POR.pdf. Acesso em: 29 dez. 2020.

DOGRA, N. K. *et al.* **Antipsoriatic effect of fatty acid enriched fraction of *Vernonia anthelmintica* Willd. fruits.** Journal of Ethnopharmacology, v. 224, p. 85-90, 2018. DOI:10.1016/j.jep.2018.05.038.

DOMINGUEZ, M. *et al.* **Complement interaction with trypanosomatid promastigotes in normal human serum.** Journal of Experimental Medicine, v. 195, p. 451-459, 2002. DOI:10.1084/jem.20011319.

DORLO, T. P. C. *et al.* **Miltefosine: a review of its pharmacology and therapeutic efficacy in the treatment of leishmaniasis.** Journal of Antimicrobial Chemotherapy, v. 67, p. 2576-2597, 2012. DOI:10.1093/jac/dks275.

DUNNING, T. **Aromatherapy: Overview, safety and quality issues.** OA Alternative Medicine, v. 1, 2013. DOI:10.13172/2052-7845-1-1-518.

EDRIS, A. E. **Pharmaceutical and therapeutic potentials of essential oils and their individual volatile constituents: a review.** Phytotherapy Research, v. 21, 308-323, 2007. DOI:10.1002/ptr.2072.

EGBUNG, G. E. *et al.* **The lipid lowering and cardioprotective effects of *Vernonia calvoana* ethanol extract in acetaminophen-treated rats.** Medicines, v. 4, 2017. DOI:10.3390/medicines4040090.

EGEDIGWE, C. A. *et al.* **Aqueous and methanol extracts of *Vernonia amygdalina* leaves exert their anti-obesity effects through the modulation of appetite-regulatory hormones.** Pharmaceutical Biology, v. 54, p. 3232-3236, 2016. DOI:10.1080/13880209.2016.1216135.

EKELEME-EGEDIGWE, C. A. *et al.* **Modulatory effects of dietary supplementation by *Vernonia amygdalina* on high-fat-diet-induced obesity in Wistar rats.** Acta Scientiarum Polonorum Technologia Alimentaria, v. 16, p. 431-442, 2017. DOI:10.17306/J.AFS.0504.

ERUKAINURE, O. L. *et al.* **Histochemistry, phenolic content, antioxidant, and anti-diabetic activities of *Vernonia amygdalina* leaf extract.** Journal of Food Biochemistry, v. 43, 2018. DOI:10.1111/jfbc.12737.

ERUKAINURE, O. L. *et al.* ***Vernonia amygdalina* Del. stimulated glucose uptake in brain tissues enhances antioxidative activities; and modulates functional chemistry and dysregulated metabolic pathways.** Metabolic Brain Disease, v. 34, p. 721-732, 2019. DOI:10.1007/s11011-018-0363-7.

ESCHENMOSER, A.; ARIGONI, D. **Revisited after 50 years: the “stereochemical interpretation of the biogenetic isoprene rule for the triterpenes”.** Helvetica Chimica Acta, v. 88, p. 3011-3050, 2005. DOI:10.1002/hlca.200590245.

EZEONU, I. M. *et al.* **Immuno-modulatory properties of prebiotics extracted from *Vernonia amygdalina*.** African Journal of Traditional, Complementary and Alternative Medicines, v. 13, p. 11-17, 2016. DOI:10.21010/ajtcam.v13i6.3.

- FACHRUNISA, D. *et al.* **Cell cycle inhibition and apoptotic induction of *Vernonia amygdalina* Del. leaves extract on MCF-7 cell line.** Open Access Macedonian Journal of Medical Sciences, v. 7, p. 3807-3810, 2019. DOI:10.3889/oamjms.2019.509.
- FARIA, M. S. *et al.* ***Leishmania* inhibitor of serine peptidase 2 prevents TLR4 activation by neutrophil elastase promoting parasite survival in murine macrophages.** Journal of Immunology, v. 186, p. 411-422, 2011. DOI:10.4049/jimmunol.1002175.
- FARIA, M. S. *et al.* **Toll-like receptors in *Leishmania* infections: guardians or promoters?** Journal of Parasitology Research, v. 2012, 2012. DOI:10.1155/2012/930257.
- FELIPE L. O.; BICAS, J. L. **Terpenos, aromas e a química dos compostos naturais.** Química Nova na Escola, v. 39, p. 120-130, 2017. DOI:10.21577/0104-8899.20160068.
- FIGUEIREDO, L. S. *et al.* **Efeito da época de colheita na produção de fitomassa e rendimento de óleo essencial de alecrim-pimenta (*Lippia sidoides* Cham.).** Revista Brasileira de Plantas Mediciniais, v. 11, p. 154-158, 2009. DOI:10.1590/S1516-05722009000200007.
- FILARDY, A. A. *et al.* **Pro-inflammatory clearance of apoptotic neutrophils induces an IL-12 (low) IL-10 (high) regulatory phenotype in macrophages.** Journal of Immunology, v. 185, p. 2044-2050, 2010. DOI:10.4049/jimmunol.1000017.
- FILIZOLA, L. R. S. **Estudo farmacognóstico de *Vernonia brasiliiana* (L.) Druce (Asteraceae) e determinação de sua atividade biológica.** 2003. 104 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) - Universidade Federal de Pernambuco, Recife, 2003.
- FILIZOLA, L. R. S. *et al.* **Anatomia dos órgãos vegetativos de *Vernonia brasiliiana* (L) Druce.** Latin American Journal of Pharmacy, v. 22, p. 299-303, 2003.
- FISEHA, A. *et al.* **Phytochemical investigations of *Vernonia galamensis* seeds.** Chemistry of Natural Compounds, v. 46, p. 692-695, 2010. DOI:10.1007/s10600-010-9717-z.
- FLANDIN, J. F. *et al.* **RNA interference reveals a role for TLR2 and TLR3 in the recognition of *Leishmania donovani* promastigotes by interferon-gamma-primed macrophages.** European Journal of Immunology, v. 36, p. 411-420, 2006. DOI:10.1002/eji.200535079.
- FOGLIA MANZILLO, V. *et al.* **Prospective study on the incidence and progression of clinical signs in naive dogs naturally infected by *Leishmania infantum*.** PLoS Neglected Tropical Diseases, v. 7, 2013. DOI:10.1371/journal.pntd.0002225.
- FORMAGIO, A. S. *et al.* **The flavonoid content and antiproliferative, hypoglycaemic, anti-inflammatory and free radical scavenging activities of *Annona dioica* St. Hill.** BMC Complementary and Alternative Medicine, v. 13, 2013. DOI:10.1186/1472-6882-13-14.
- GEERING, B.; SIMON, H. U. **Peculiarities of cell death mechanisms in neutrophils.** Cell Death and Differentiation, v. 18, p. 1457-1469, 2011. DOI:10.1038/cdd.2011.75.

GHARBI, M. *et al.* **Leishmaniosis (*Leishmania infantum* infection) in dogs.** Revue Scientifique et Technique, v. 34, p. 613-626, 2015. DOI:10.20506/rst.34.2.2384.

GOBBO-NETO, L.; LOPES, N.P. **Plantas medicinais: fatores de influência no conteúdo de metabólitos secundários.** Química Nova, v. 30, p. 374-381, 2007. DOI:10.1590/S0100-40422007000200026.

GONÇALVES-DE-ALBUQUERQUE, S. D. C. *et al.* **The equivocal role of Th17 cells and neutrophils on immunopathogenesis of leishmaniasis.** Frontiers in Immunology, v. 8, 2017. DOI:10.3389/fimmu.2017.01437.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. **Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas.** Revista Brasileira de Epidemiologia, v. 7, p. 338-349, 2004. DOI:10.1590/S1415-790X2004000300011.

GUPTA, G. *et al.* **Mechanisms of immune evasion in leishmaniasis.** Advances in Applied Microbiology, v. 82 p. 155-184, 2013. DOI:10.1016/B978-0-12-407679-2.00005-3.

HABTAMU, A.; MELAKU, Y. **Antibacterial and antioxidant compounds from the flower extracts of *Vernonia amygdalina*.** Advances in Pharmacological Sciences, v. 2018, 2018. DOI:10.1155/2018/4083736.

HARRINGTON, L. E. *et al.* **Interleukin 17-producing CD4+ effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages.** Nature Immunology, v. 6, p. 1123-1132, 2005. DOI:10.1038/ni1254.

HARTLEY, M. A. *et al.* ***Leishmania* RNA virus: when the host pays the toll.** Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, v. 2, 2012. DOI:10.3389/fcimb.2012.00099.

HASIBUAN, P. A. Z. *et al.* **The anticancer activities of *Vernonia amygdalina* Delile. Leaves on 4T1 breast cancer cells through phosphoinositide 3-kinase (PI3K) pathway.** Heliyon, v. 6, 2020. DOI:10.1016/j.heliyon.2020.e04449.

HATTORI, E. K. O.; NAKAJIMA, J. N. **A família Asteraceae na estação de pesquisa e desenvolvimento ambiental Galheiro, Perdizes, Minas Gerais, Brasil.** Rodriguésia, v. 58, p. 687-749, 2008. DOI:10.1590/2175-7860200859405.

HILGARD, P. *et al.* **Alkylphosphocholines: a new class of membrane active anticancer agents.** Cancer Chemotherapy and Pharmacology, v. 32, p. 90-95, 1993. DOI:10.1007/BF00685608.

HOWARD, C. B. *et al.* **Chemotherapeutic vulnerability of triple-negative breast cancer cell-derived tumors to pretreatment with *Vernonia amygdalina* aqueous extracts.** Anticancer Research, v. 36, p. 3933-3943, 2016.

HUYNH, C.; ANDREWS, N. W. **Iron acquisition within host cells and the pathogenicity of *Leishmania*.** Cellular Microbiology, v. 10, p. 293-300, 2008. DOI:10.1111/j.1462-5822.2007.01095.x.

INIESTA, V. *et al.* **The inhibition of arginase by N(omega)-hydroxy-L-arginine controls the growth of *Leishmania* inside macrophages.** Journal of Experimental Medicine, v. 193, p. 777-784, 2001. DOI:10.1084/jem.193.6.777.

INNGJERDINGEN, K. T. *et al.* **Inhibition of *Helicobacter pylori* adhesion to human gastric adenocarcinoma epithelial cells by aqueous extracts and pectic polysaccharides from the roots of *Cochlospermum tinctorium* A. Rich. and *Vernonia kotschyana* Sch. Bip. ex Walp.** Fitoterapia, v. 95, p. 127-132, 2014. DOI:10.1016/j.fitote.2014.03.009.

IPEK, E. *et al.* **Genotoxicity and antigenotoxicity of *Origanum oil* and carvacrol evaluated by Ames *Salmonella*/microsomal test.** Food Chemistry, v. 93, p. 551-556, 2005. DOI:10.1016/j.foodchem.2004.12.034.

ITO, T. *et al.* **New sesquiterpene lactones, vernonilides A and B, from the seeds of *Vernonia anthelmintica* in Uyghur and their antiproliferative activities.** Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters, v. 26, p. 3608-3611, 2016. DOI:10.1016/j.bmcl.2016.06.009.

IVES, A. *et al.* ***Leishmania* RNA virus controls the severity of mucocutaneous leishmaniasis.** Science, v. 331, p. 775-778, 2011. DOI:10.1126/science.1199326.

JAMIL, S. *et al.* **Evaluation of anti-inflammatory and anti-oxidant potential of seed extracts of *Vernonia anthelmintica*.** Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 30, p.755-760, 2017.

JAMIL, S. *et al.* **In vivo evaluation of antihyperlipidemic, antihyperglycemic and hepatoprotective effects of *Vernonia anthelmintica* seeds in diet model.** Pakistan Journal of Pharmaceutical Sciences, v. 31, p. 813-820, 2018.

JAWED, J. J. *et al.* **Functional aspects of T cell diversity in visceral leishmaniasis.** Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 117, 2019. DOI:10.1016/j.biopha.2019.109098.

JAWED, J. J. *et al.* **SLA-PGN-primed dendritic cell-based vaccination induces Th17-mediated protective immunity against experimental visceral leishmaniasis: a crucial role of PKC β .** Pathogens and Disease, v. 74, 2016. DOI:10.1093/femspd/ftw041.

JAWED, J. J. *et al.* **Immunomodulatory effect of Arabinosylated lipoarabinomannan restrict the progression of visceral leishmaniasis through NOD2 inflammatory pathway: functional regulation of T cell subsets.** Biomedicine and Pharmacotherapy, v. 106, p. 724-732, 2018. DOI:10.1016/j.biopha.2018.06.167.

JHA, T. K. *et al.* **Miltefosine, an oral agent, for the treatment of Indian visceral leishmaniasis.** New England Journal of Medicine, v. 341, p. 1795-1800, 1999. DOI:10.1056/NEJM199912093412403.

JOÃO, C. *et al.* **Immunoglobulin promotes the diversity and the function of T cells.** European Journal of Immunology, v. 36, p. 1718-1728, 2006. DOI:10.1002/eji.200635908.

JOHN, B.; HUNTER, C. A. **Immunology. Neutrophil soldiers or Trojan Horses?** Science, v. 321, p. 917-918, 2008. DOI:10.1126/science.1162914.

- JOHNSON, W. *et al.* **Therapeutic mechanisms of *Vernonia amygdalina* Delile in the treatment of prostate cancer.** *Molecules*, v. 22, 2017. DOI:10.3390/molecules22101594.
- KAMBIZI, L.; AFOLAYAN, A. J. **An ethnobotanical study of plants used for the treatment of sexually transmitted diseases (njovhera) in Guruve District, Zimbabwe.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 77, p. 5-9, 2001. DOI:10.1016/s0378-8741(01)00251-3.
- KARMAKAR, S. *et al.* **TLR4 and NKT cell synergy in immunotherapy against visceral leishmaniasis.** *PLoS Pathogens*, v. 8, 2012. DOI:10.1371/journal.ppat.1002646.
- KAUSHAL, H. *et al.* **Role of CD8(+) T cells in protection against *Leishmania donovani* infection in healed visceral leishmaniasis individuals.** *BMC Infectious Diseases*, v. 14, 2014. DOI:10.1186/s12879-014-0653-6.
- KAVOOSI, G. *et al.* ***Leishmania major* lipophosphoglycan: discrepancy in toll-like receptor signaling.** *Experimental Parasitology*, v. 124, p. 214-218, 2010. DOI:10.1016/j.exppara.2009.09.017.
- KAVOOSI, G. *et al.* **The involvement of TLR2 in cytokine and reactive oxygen species (ROS) production by PBMCs in response to *Leishmania major* phosphoglycans (PGs).** *Parasitology*, v. 136, p. 1193-1199, 2009. DOI:10.1017/S0031182009990473.
- KAYE, P., SCOTT, P. **Leishmaniasis: complexity at the host-pathogen interface.** *Nature Reviews Microbiology*, v. 9, p. 604-615, 2011. DOI:10.1038/nrmicro2608.
- KEDZIERSKI, L. **Leishmaniasis.** *Human Vaccines*, v. 7, p. 1204-1214, 2011. DOI:10.4161/hv.7.11.17752.
- KEELEY, S. C.; JONES, S. B. **Distribution of pollen types in *Vernonia* (Vernonieae: Compositae).** *Systematic Botany*, v. 4, p. 195-202, 1979. DOI:10.2307/2418418.
- KEELEY, S. *et al.* **Phylogeny of the “evil tribe” (Vernonieae: Compositae) reveals Old/New World long distance dispersal: Support from separate and combined congruent datasets (trnL1, ndhF, ITS).** *Molecular Phylogenetics and Evolution*, v. 44, p. 89-103, 2007. DOI:10.1016/j.ympev.2006.12.024.
- KEMAL, J. *et al.* **In vitro acaricidal activity of selected medicinal plants traditionally used against ticks in Eastern Ethiopia.** *Journal of Parasitology Research*, v. 2020, 2020. DOI:10.1155/2020/7834026.
- KETSUWAN, N. *et al.* **Antioxidant compounds and activities of the stem, flower, and leaf extracts of the anti-smoking Thai medicinal plant: *Vernonia cinerea* Less.** *Drug Design, Development and Therapy*, v. 11, p. 383-391, 2017. DOI:10.2147/DDDT.S126882.
- KHOURI, R. *et al.* **IFN-beta impairs superoxide-dependent parasite killing in human macrophages: evidence for a deleterious role of SOD1 in cutaneous leishmaniasis.** *Journal of Immunology*, v. 182, p. 2525-2531, 2009. DOI:10.4049/jimmunol.0802860.
- KIMANI, N. M. *et al.* **Anti-trypanosomatid elemanolide sesquiterpene lactones from *Vernonia lasiopus* O. Hoffm.** *Molecules*, v. 22, 2017. DOI:10.3390/molecules22040597.

KOUTINAS, A. F. *et al.* **Clinical considerations on canine visceral leishmaniasis in Greece: a retrospective study of 158 cases (1989-1996).** Journal of the American Animal Hospital Association, v. 35, p. 376-383, 1999. DOI:10.5326/15473317-35-5-376.

KROPF, P. *et al.* **Factors influencing *Leishmania major* infection in IL-4-deficient BALB/c mice.** Parasite Immunology, v. 25, p. 439-447, 2003. DOI:10.1111/j.1365-3024.2003.00655.x.

KROPF, P. *et al.* **Infection of C57BL/10ScCr and C57BL/10ScNCr mice with *Leishmania major* reveals a role for toll-like receptor 4 in the control of parasite replication.** Journal of Leukocyte Biology, v. 76, p. 48-57, 2004a. DOI:10.1189/jlb.1003484.

KROPF, P. *et al.* **Toll-like receptor 4 contributes to efficient control of infection with the protozoan parasite *Leishmania major*.** Infection and Immunity, v. 72, p. 1920-1928, 2004b. DOI:10.1128/IAI.72.4.1920-1928.2004.

KÜLKAMP, I. C. *et al.* **Aceitação de práticas não-convencionais em saúde por estudantes de medicina da Universidade do Sul de Santa Catarina.** Revista Brasileira de Educação Médica, v. 31, p. 229-235, 2007. DOI:10.1590/S0100-55022007000300005.

LAGE, O. S. *et al.* ***Strychnos pseudoquina* and its purified compounds present an effective in vitro antileishmanial activity.** Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine, v. 2013, 2013. DOI:10.1155/2013/304354.

LAURENTI, M. D. *et al.* **Asymptomatic dogs are highly competent to transmit *Leishmania (Leishmania) infantum chagasi* to the natural vector.** Veterinary Parasitology, v. 196, p. 296-300, 2013. DOI:10.1016/j.vetpar.2013.03.017.

LÁZARO-SOUZA, M. *et al.* ***Leishmania infantum* lipophosphoglycan-deficient mutants: a tool to study host cell-parasite interplay.** Frontiers in Microbiology, v. 9, 2018. DOI:10.3389/fmicb.2018.00626.

LEDOUX, A. *et al.* **Antiplasmodial, anti-chikungunya virus and antioxidant activities of 64 endemic plants from the Mascarene Islands.** International Journal of Antimicrobial Agents, v. 52, p. 622-628, 2018. DOI:10.1016/j.ijantimicag.2018.07.017.

LEONARD, R. *et al.* **Randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter trial of 6% miltefosine solution, a topical chemotherapy in cutaneous metastases from breast cancer.** Journal of Clinical Oncology, v. 19, p. 4150-4159, 2001. DOI:10.1200/JCO.2001.19.21.4150.

LEVEQUE, L. *et al.* **Interleukin 2-mediated conversion of ovarian cancer-associated CD4+ regulatory T cells into proinflammatory interleukin 17-producing helper T cells.** Journal of Immunotherapy, v. 32, p. 101-108, 2009. DOI:10.1097/CJI.0b013e318195b59e.

LINDOSO, J. A. L. *et al.* **Review of the current treatments for leishmaniases.** Research and Reports in Tropical Medicine, v. 3, p. 69-77, 2012. DOI:10.2147/RRTM.S24764.

LIU, J. *et al.* **MYB transcription factors as regulators of phenylpropanoid metabolism in plants.** *Molecular Plant*, v. 8, p. 689-708, 2015. DOI:10.1016/j.molp.2015.03.012.

LIU, M. C. *et al.* **Enhanced antigen presenting and T cell functions during late-phase allergic responses in the lung.** *Clinical and Experimental Allergy*, v. 48, p. 334-342, 2018. DOI:10.1111/cea.13054.

LOWE, H. I. C. *et al.* **The anti-cancer activity of *Vernonia divaricata* Sw against leukaemia, breast and prostate cancers in vitro.** *West Indian Medical Journal*, v. 63, p. 285-288, 2014. DOI:10.7727/wimj.2013.232.

LUCKHEERAM, R. V. *et al.* **CD4⁺T cells: differentiation and functions.** *Clinical and Developmental Immunology*, v. 2012, 2012. DOI:10.1155/2012/925135.

LUNA, E. C. *et al.* **Active essential oils and their components in use against neglected diseases and arboviroses.** *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, v. 2019, 2019. DOI:10.1155/2019/6587150.

LUQUE-ORTEGA, J. R.; RIVAS, L. **Miltefosine (hexadecylphosphocholine) inhibits cytochrome C oxidase in *Leishmania donovani* promastigotes.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 51, p. 1327-1332, 2007. DOI:10.1128/AAC.01415-06.

MADZUKI, I. N. *et al.* ***Vernonia amygdalina* inhibited osteoarthritis development by anti-inflammatory and anticollagenase pathways in cartilage explant and osteoarthritis-induced rat model.** *Phytotherapy Research*, v. 33, p. 1784-1793, 2019. DOI:10.1002/ptr.6366.

MAIA, A. I. V. *et al.* **Óleos essenciais das folhas de *Vernonia remotiflora* e *Vernonia brasiliensis*: composição química e atividade biológica.** *Química Nova*, v. 33, p. 584-586, 2010. DOI:10.1590/S0100-40422010000300018.

MAIA-ELKHOURY, A. N. *et al.* **Visceral leishmaniasis in Brazil: trends and challenges.** *Cadernos de Saúde Pública*, v. 24, p. 2941-2947, 2008. DOI:10.1590/S0102-311X2008001200024.

MAMAT, N. *et al.* **Potential anti-vitiligo properties of cynarine extracted from *Vernonia anthelmintica* (L.) Willd.** *International Journal of Molecular Medicine*, v. 42, p. 2665-2675, 2018. DOI:10.3892/ijmm.2018.3861.

MANNA, L. *et al.* **Interferon-gamma (INF-gamma), IL4 expression levels and *Leishmania* DNA load as prognostic markers for monitoring response to treatment of leishmaniotic dogs with miltefosine and allopurinol.** *Cytokine*, v. 44, p. 288-292, 2008. DOI:10.1016/j.cyto.2008.08.017.

MANNA, L. *et al.* **Long-term follow-up of dogs with leishmaniosis treated with meglumine antimoniate plus allopurinol versus miltefosine plus allopurinol.** *Parasite and Vectors*, v. 8, 2015. DOI:10.1186/s13071-015-0896-0.

- MANNA, L. *et al.* **Study of efficacy of miltefosine and allopurinol in dogs with leishmaniasis.** *Veterinary Journal*, v. 182, p. 441-445, 2009. DOI:10.1016/j.tvjl.2008.08.009.
- MARTINS, M. M. *et al.* **Chemical composition, antimicrobial and antiprotozoal activity of essential oils from *Vernonia brasiliensis* (Less) Druce (Asteraceae).** *Journal of Essential Oil Bearing Plants*, v. 18, p. 561-569, 2015. DOI:10.1080/0972060X.2014.895683.
- MARTINS-MELO, F. R. *et al.* **The burden of neglected tropical diseases in Brazil, 1990–2016: A subnational analysis from the global burden of disease study 2016.** *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 12, 2018. DOI:10.1371/journal.pntd.0006559.
- MATEO, M. *et al.* **Comparative study on the short term efficacy and adverse effects of miltefosine and meglumine antimoniate in dogs with natural leishmaniasis.** *Parasitology Research*, v. 105, p. 155-162, 2009. DOI:10.1007/s00436-009-1375-3.
- MATTIN, M. J. *et al.* **The frequency and distribution of canine leishmaniasis diagnosed by veterinary practitioners in Europe.** *Veterinary Journal*, v. 200, p. 410-419, 2014. DOI:10.1016/j.tvjl.2014.03.033.
- MBEMI, A.T. *et al.* ***Vernonia calvoana* shows promise towards the treatment of ovarian cancer.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 21, 2020. DOI:10.3390/ijms21124429.
- MEDEIROS, M. G. F. *et al.* **In vitro antileishmanial activity and cytotoxicity of essential oil from *Lippia sidoides* Cham.** *Parasitology International*, v. 60, p. 237-241, 2011. DOI:10.1016/j.parint.2011.03.004.
- MELÉNDEZ-LAZO, A. *et al.* **Clinicopathological findings in sick dogs naturally infected with *Leishmania infantum*: Comparison of five different clinical classification systems.** *Research in Veterinary Science*, v. 117, p. 18-27, 2018. DOI:10.1016/j.rvsc.2017.10.011.
- MENDES-PINTO, M. M. **Carotenoid breakdown products the—norisoprenoids—in wine aroma.** *Archives of Biochemistry and Biophysics*. v. 483, p. 236-245, 2009. DOI:10.1016/j.abb.2009.01.008.
- MENEZES, V. A. *et al.* **Terapêutica com plantas medicinais: percepção de profissionais da estratégia de saúde da família de um município do agreste pernambucano.** *Odonto*, v. 20, p. 111-122, 2012. DOI:10.15603/2176-1000/odonto.v1n1p111-122.
- MENTEN, P. *et al.* **Macrophage inflammatory protein-1.** *Cytokine & Growth Factor Reviews*, v. 13, p. 455-481, 2002. DOI:10.1016/s1359-6101(02)00045-x.
- MIDIAMAX. **Tratamento para leishmaniose é eficiente, mas ainda é caro para maioria.** 2018. Disponível em: <https://www.midiamax.com.br/cotidiano/2018/tratamento-para-leishmaniose-e-eficiente-mas-ainda-e-carro-para-maioria>. Acesso em: 16 jan 2021.
- MIGUEL, M. D.; MIGUEL, O. G. **Desenvolvimento de fitoterápicos.** Ribeirão Preto: Tecmed, 2004. 115 p.

MINGARI, M. C.; MORETTA, L. **Surface markers of human T lymphocytes**. *La Ricerca in Clinica e in Laboratorio*, v. 12, p. 439-448, 1982. DOI:10.1007/BF02909395.

MIRÓ, G. *et al.* **Multi-centric and controlled clinical field study to evaluate the efficacy and safety of the combination of miltefosine and allopurinol in the treatment of canine leishmaniasis**. *Veterinary Dermatology*, v. 20, p. 397-404, 2009. DOI:10.1111/j.1365-3164.2009.00824.x.

MOMO, C. *et al.* **Morphological changes in the bone marrow of the dogs with visceral leishmaniasis**. *Veterinary Medicine International*, v. 2014, 2014. DOI:10.1155/2014/150582.

MONDELAERS, A. *et al.* **Genomic and molecular characterization of miltefosine resistance in *Leishmania infantum* strains with either natural or acquired resistance through experimental selection of intracellular amastigotes**. *PLoS One*, v. 11, 2016. DOI:10.1371/journal.pone.0154101.

MORAIS, L. A. S. **Influência dos fatores abióticos na composição química dos óleos essenciais**. *Horticultura Brasileira*, v. 27, p. 4050-4063, 2009.

MOREIRA, R. R. D. *et al.* **Composition and leishmanicidal activity of the essential oil of *Vernonia polyanthes* Less (Asteraceae)**. *Natural Products Research*, v. 31, p. 2905-2908, 2017. DOI:10.1080/14786419.2017.1299723.

MORENO, I. *et al.* **Kinetic analysis of ex vivo human blood infection by *Leishmania***. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 4, 2010. DOI:10.1371/journal.pntd.0000743.

MOSISA GUDETA, B. *et al.* **Evaluation of anti-diarrheal activity of 80% methanol extracts of *Vernonia amygdalina* Delile (asteraceae) leaves in mice**. *Journal of Experimental Pharmacology*, v. 12, p. 455-462, 2020. DOI:10.2147/JEP.S282669.

MOSSER, D. M.; EDELSON, P. J. **The third component of complement (C3) is responsible for the intracellular survival of *Leishmania major***. *Nature*, v. 327, p. 329-331, 1987. DOI:10.1038/327329b0.

MURASE, L. S. *et al.* **The role of metalloproteases in *Leishmania* species infection in the New World: a systematic review**. *Parasitology*, v. 145, p. 1499-1509, 2018. DOI:10.1017/S0031182018000367.

MUTHONI GUCHU, B. *et al.* **In vitro antioxidant activities of methanolic extracts of *Caesalpinia volkensii* Harms., *Vernonia lasiopus* O. Hoffm., and *Acacia hockii* De Wild**. *Evidence-Based Complementary and Alternative Medicine*, v. 2020, 2020. DOI:10.1155/2020/3586268.

MYERS, N. *et al.* **Biodiversity hotspots for conservation priorities**. *Nature*, v. 403, p. 853-858, 2000. DOI:10.1038/35002501.

- NAOWABOOT, J. *et al.* **Vernonia cinerea** water extract improves insulin resistance in high fat diet-induced obese mice. *Nutrition Research*, v. 56, p. 51-60, 2018. DOI:10.1016/j.nutres.2018.04.020.
- NAUSEEF, W. M.; BORREGAARD, N. **Neutrophils at work**. *Nature Immunology*, v. 15, p. 602-611, 2014. DOI:10.1038/ni.2921.
- NAWALE, S. *et al.* **Data of in vivo screening of antiulcer activity for methanolic extract of Vernonia elaeagnifolia** DC. *Data in Brief*, v. 23, 2019. DOI:10.1016/j.dib.2019.103753.
- NOEL, J. P. *et al.* **Structure function relationships in plant phenylpropanoid biosynthesis**. *Current Opinion in Plant Biology*, v. 8, p. 249-253, 2005. DOI:10.1016/j.pbi.2005.03.013.
- NOLI C.; SARIDOMICHELAKIS, M. N. **An update on the diagnosis and treatment of canine leishmaniosis caused by Leishmania infantum (syn. L. chagasi)**. *Veterinary Journal*, v. 202, p. 425-435, 2014. DOI:10.1016/j.tvjl.2014.09.002.
- OBOH, G. *et al.* **Characterization and neuroprotective properties of alkaloid extract of Vernonia amygdalina Delile in experimental models of Alzheimer's disease**. *Drug and Chemical Toxicology*, p. 1-10, 2020. DOI:10.1080/01480545.2020.1773845.
- OKETCH-RABAH, H. A. *et al.* **Antiprotozoal properties of 16,17-dihydrobrachycalyxolide from Vernonia brachycalyx**. *Planta Medica*, v. 64, p. 559, 562, 1998. DOI:10.1055/s-2006-957514.
- OKETCH-RABAH, H. A. *et al.* **Two new antiprotozoal 5-methylcoumarins from Vernonia brachycalyx**. *Journal of Natural Products*, v. 60, p. 458-461, 1997. DOI:10.1021/np970030o.
- OKON, U. A.; UMOREN, I. U. **Comparison of antioxidant activity of insulin, Ocimum gratissimum L., and Vernonia amygdalina L. in type 1 diabetic rat model**. *Journal of Integrative Medicine*, v. 15, p. 302-309, 2017. DOI:10.1016/S2095-4964(17)60332-7.
- OLADELE, J.O. *et al.* **Neuroprotective mechanism of Vernonia amygdalina in a rat model of neurodegenerative diseases**. *Toxicology Reports*, v. 7, p. 1223-1232, 2020. DOI:10.1016/j.toxrep.2020.09.005.
- OLIVA, G. *et al.* **A randomised, double-blind, controlled efficacy trial of the LiESP/QA-21 vaccine in naïve dogs exposed to two Leishmania infantum transmission seasons**. *PLoS Neglected Tropical Diseases*, v. 8, 2014. DOI:10.1371/journal.pntd.0003213.
- OLIVEIRA, I.D.S.D.S. *et al.* **Vernonia polysphaera Baker: Anti-inflammatory activity in vivo and inhibitory effect in LPS-stimulated RAW 264.7 cells**. *PLoS One*, v. 14, 2019. DOI:10.1371/journal.pone.0225275.
- OLIVEIRA-RIBEIRO, C. *et al.* **Clinical and laboratory profiles of patients with early spontaneous healing in cutaneous localized leishmaniasis: a historical cohort study**. *BMC Infectious Diseases*, v. 17, 2017. DOI:10.1186/s12879-017-2658-4.

OLIVIER, M. *et al.* **Subversion mechanisms by which *Leishmania* parasites can escape the host immune response: a signaling point of view.** *Clinical Microbiology Reviews*, v. 18, p. 293-305, 2005. DOI:10.1128/CMR.18.2.293-305.2005.

OMOJOKUN, O. S. *et al.* **Alkaloid extracts from Bitter leaf (*Vernonia amygdalina*) and Black nightshade (*Solanum nigrum*) inhibit phosphodiesterase-5, arginase activities and oxidative stress in rats penile tissue.** *Journal of Food Biochemistry*, v. 43, 2019. DOI:10.1111/jfbc.12889.

OMOREGIE, E. S.; PAL, A. **Antiplasmodial, antioxidant and immunomodulatory activities of ethanol extract of *Vernonia amygdalina* del. leaf in Swiss mice.** *Avicenna Journal of Phytomedicine*, v. 6, p. 236-247, 2016.

ONASANWO, S. A. *et al.* **Anti-nociceptive and antiinflammatory potentials of *Vernonia amygdalina* leaf extract via reductions of leucocyte migration and lipid peroxidation.** *Journal of Intercultural Ethnopharmacology*, v. 6, p. 192-198, 2017. DOI:10.5455/jice.20170330010610.

OUELLETTE, M. *et al.* **Leishmaniasis: drugs in the clinic, resistance and new developments.** *Drug Resistance Updates*, v. 7, p. 257-266, 2004. DOI:10.1016/j.drug.2004.07.002.

OUYANG, W. *et al.* **The biological functions of T helper 17 cell effector cytokines in inflammation.** *Immunity*, v. 28, p. 454-467, 2008. DOI:10.1016/j.immuni.2008.03.004.

PALTRINIERI, S. *et al.* **Guidelines for diagnosis and clinical classification of leishmaniasis in dogs.** *Journal of the American Veterinary Medical Association*, v. 236, p. 1184-1191, 2010. DOI:10.2460/javma.236.11.1184.

PÉREZ-VICTORIA, F. J. *et al.* **Mechanisms of experimental resistance of *Leishmania* to miltefosine: implications for clinical use.** *Drug Resistance Updates*, v. 9, p. 26-39, 2006. DOI:10.1016/j.drug.2006.04.001.

PERVEEN, S. **Introductory Chapter: Terpenes and Terpenoids.** *In: PERVEEN, S. Terpenes and Terpenoids*. 1. ed. Londres: IntechOpen, 2018. p. 1-12. DOI:10.5772/intechopen.79683.

PICHERSKY, E. *et al.* **Biosynthesis of plant volatiles: nature's diversity and ingenuity.** *Science*, v. 311, p. 808-811, 2006. DOI:10.1126/science.1118510.

PLEVRAKI, K. *et al.* **Effects of allopurinol treatment on the progression of chronic nephritis in canine leishmaniosis (*Leishmania infantum*).** *Journal of Veterinary Internal Medicine*, v. 20, p. 228-233, 2006. DOI:10.1892/0891-6640(2006)20[228:eoatot]2.0.co;2.

PODINOVSKAIA, M.; DESCOTEAUX, A. ***Leishmania* and the macrophage: a multifaceted interaction.** *Future Microbiology*, v. 10, p. 111-129, 2015. DOI:10.2217/fmb.14.103

- PUENTES, S. M. *et al.* **Serum resistance of metacyclic stage *Leishmania major* promastigotes is due to release of C5b-9.** *Journal of Immunology*, v. 145, p. 4311-4316, 1990.
- QUATTROCCHI, U. **CRC world dictionary of plant names: common names, scientific names, eponyms, synonyms, and etymology.** 1. ed. United States: CRC Press, 1999. 640 p.
- QUINNELL, R. J.; COURTENAY, O. **Transmission, reservoir hosts and control of zoonotic visceral leishmaniasis.** *Parasitology*, v. 136, p. 1915-1934, 2009. DOI:10.1017/S0031182009991156.
- RABB, H. **The T cell as a bridge between innate and adaptive immune systems: implications for the kidney.** *Kidney International.*, v. 61, p. 1935-1946, 2002. DOI:10.1046/j.1523-1755.2002.00378.x.
- RAI, A. K. *et al.* **Regulatory T cells suppress T cell activation at the pathologic site of human visceral leishmaniasis.** *PLoS One*, v. 7, 2012. DOI:10.1371/journal.pone.0031551.
- RANGEL, E. F.; VILELA, M. L. ***Lutzomyia longipalpis* (Diptera, Psychodidae, Phlebotominae) and urbanization of visceral leishmaniasis in Brazil.** *Cadernos de Saúde Pública*, v. 24, p. 2948-2952, 2008. DOI:10.1590/S0102-311X2008001200025.
- REGLI, I. B. *et al.* **Survival mechanisms used by some *Leishmania* species to escape neutrophil killing.** *Frontiers in Immunology*, v. 8, 2017. DOI:10.3389/fimmu.2017.01558.
- REGUERA, R. M. *et al.* **Current status on prevention and treatment of canine leishmaniasis.** *Veterinary Parasitology*, v. 227, p. 98-114, 2016. DOI:10.1016/j.vetpar.2016.07.011.
- RETNOSARI, S. *et al.* **Profile of the Indonesian essential oil from *Melaleuca cajuputi*.** *Advances in Engineering Research*, v. 71, p. 14-19, 2018. DOI:10.2991/snk-18.2018.3.
- RIBEIRO, R. R. *et al.* **Canine leishmaniasis: an overview of the current status and strategies for control.** *BioMed Research International*, v. 2018, 2018. DOI:10.1155/2018/3296893.
- RIBEIRO-GOMES F. L. *et al.* **Neutrophils activate macrophages for intracellular killing of *Leishmania major* through recruitment of TLR4 by neutrophil elastase.** *Journal of Immunology*, v. 179, p. 3988-3994, 2007. DOI:10.4049/jimmunol.179.6.3988.
- ROBERTSON, F. C. *et al.* **NKT cell networks in the regulation of tumor immunity.** *Frontiers in Immunology*, v. 5, 2014. DOI:10.3389/fimmu.2014.00543.
- RODRIGUES, I. A. *et al.* **Natural products: Insights into Leishmaniasis inflammatory response.** *Mediators of Inflammation*, v. 2015, 2015. DOI:10.1155/2015/835910.
- RODRIGUES, K. C. M. *et al.* **Anti-nociceptive and antiinflammatory potentials of *Vernonia amygdalina* leaf extract via reductions of leucocyte migration and lipid peroxidation.** *International Journal of Molecular Sciences*, v. 17, 2016. DOI:10.3390/ijms17121929.

RODRÍGUEZ-CONCEPCIÓN, M.; BORONAT, A. **Elucidation of the methylerythritol phosphate pathway for isoprenoid biosynthesis in bacteria and plastids. a metabolic milestone achieved through genomics.** *Plant Physiology*, v. 130, p. 1079-1089, 2002. DOI:10.1104/pp.007138.

ROJAS DE ARIAS, A. *et al.* **Mutagenicity, insecticidal and trypanocidal activity of some Paraguayan Asteraceae.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 45, p. 35-41, 1995. DOI:10.1016/0378-8741(94)01193-4.

ROSA, M. S. S. *et al.* **Antileishmanial activity of a linalool-rich essential oil from *Croton cajucara*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 47, p. 1895-1901, 2003. DOI:10.1128/AAC.47.6.1895-1901.2003.

SANTOS NOGUEIRA, F. *et al.* **Use of miltefosine to treat canine visceral leishmaniasis caused by *Leishmania infantum* in Brazil.** *Parasites and Vectors*, v. 12, 2019. DOI:10.1186/s13071-019-3323-0.

SANTOS, A. O. *et al.* **Effect of Brazilian copaiba oils on *Leishmania amazonensis*.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 120:204-208, 2008. DOI:10.1016/j.jep.2008.08.007.

SATO, W. **Cutting edge: human Th17 cells are identified as bearing CCR2+CCR5-phenotype.** *Journal of Immunology*, v. 178, p. 7525-7529, 2007. DOI:10.4049/jimmunol.178.12.7525.

SCAPINI, P.; CASSATELLA, M. A. **Social networking of human neutrophils within the immune system.** *Blood*, v. 124, p.710-719, 2014. DOI:10.1182/blood-2014-03-453217.

SCHEFER, F. A. *et al.* **Antitumoral activity of sesquiterpene lactone diacetylpiptocarphol in mice.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 198, p. 262-267, 2017. DOI:10.1016/j.jep.2017.01.022.

SHAW, S. E. *et al.* **Canine leishmaniosis in the United Kingdom: a zoonotic disease waiting for a vector?** *Veterinary Parasitology*, v. 163, p. 281-285, 2009. DOI:10.1016/j.vetpar.2009.03.025.

SHWEASH, M. *et al.* ***Leishmania mexicana* promastigotes inhibit macrophage IL-12 production via TLR-4 dependent COX-2, iNOS and arginase-1 expression.** *Molecular Immunology*, v. 48, p. 1800-1808, 2011. DOI:10.1016/j.molimm.2011.05.013.

SILVA, J. B. *et al.* **New aspects on the hepatoprotective potential associated with the antioxidant, hypocholesterolemic and anti-inflammatory activities of *Vernonia condensata* Baker.** *Journal of Ethnopharmacology*, v. 198, p. 399-406, 2017. DOI:10.1016/j.jep.2017.01.039.

SILVA, R. A. *et al.* **Effectiveness of dog collars impregnated with 4% deltamethrin in controlling visceral leishmaniasis in *Lutzomyia longipalpis* (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae) populations.** *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 113, 2018. DOI:10.1590/0074-02760170377.

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. 2018. **Coefficiente de incidência de Leishmaniose Visceral, por 100.000 habitantes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 1990 a 2017.** Disponível em: <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2018/novembro/12/LV-Coef-Incidencia.pdf>. Acesso em: 17 ago.

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. 2019a. **Leishmaniose Visceral - casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Brasil.** Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/leishvbr.def>. Acesso em: 17 ago. 2019.

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. 2019b. **Leishmaniose Visceral - casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Minas Gerais.** Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/leishvmg.def>. Acesso em: 17 ago. 2019.

SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan Net. 2019c. **Leishmaniose Visceral - casos confirmados notificados no Sistema de Informação de Agravos de Notificação – Maranhão.** Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinanet/cnv/leishvma.def>. Acesso em: 17 ago. 2019.

SINDERMANN, H.; ENGEL, J. **Development of miltefosine as an oral treatment for leishmaniasis.** Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 100, p. 17-20, 2006. DOI:10.1016/j.trstmh.2006.02.010.

SINGH, G. *et al.* **A comparison of chemical, antioxidant and antimicrobial studies of cinnamon leaf and bark volatile oils, oleoresins and their constituents.** Food and Chemical Toxicology, v. 45, p. 1650-1561, 2007. DOI:10.1016/j.fct.2007.02.031.

SIRAJ, M. A. *et al.* **Antinociceptive and sedative activity of *Vernonia patula* and predictive interactions of its phenolic compounds with the cannabinoid type 1 receptor.** Phytotherapy Research, 2020. DOI:10.1002/ptr.6876 (Epub ahead of print).

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* **Directions for the diagnosis, clinical staging, treatment and prevention of canine leishmaniosis.** Veterinary Parasitology, v. 165, p. 1-18, 2009. DOI:10.1016/j.vetpar.2009.05.022.

SOLANO-GALLEGO, L. *et al.* ***Leishmania infantum*-specific IgG, IgG1 and IgG2 antibody responses in healthy and ill dogs from endemic areas. Evolution in the course of infection and after treatment.** Veterinary Parasitology, v. 96, p. 265-276, 2001. DOI:10.1016/s0304-4017(00)00446-5.

SOLANO-GALLEGO, L.; BANETH, G. **Canine leishmaniosis - a challenging zoonosis.** European Journal of Companion Animal Practice, v. 18, p. 232-241, 2008.

SONIBARE, M. A. *et al.* **Antioxidant and antimicrobial activities of solvent fractions of *Vernonia cinerea* (L.) Less leaf extract.** African Health Sciences, v. 16, p. 629-639, 2016. DOI:10.4314/ahs.v16i2.34.

SRIVASTAV, S. *et al.* ***Leishmania donovani* exploits host deubiquitinating enzyme A20, a negative regulator of TLR signaling, to subvert host immune response.** Journal of Immunology, v. 189, p. 924-934, 2012. DOI:10.4049/jimmunol.1102845.

SRIVASTAVA, A. *et al.* **Identification of TLR inducing Th1-responsive *Leishmania donovani* amastigote specific antigens.** Molecular and Cellular Biochemistry, v. 359, p. 359-368, 2012. DOI:10.1007/s11010-011-1029-5.

SUNDAR, S. *et al.* **Oral miltefosine for Indian post-Kala-Azar dermal leishmaniasis: a randomized trial.** Tropical Medicine and International Health, v. 18, p. 96-100, 2013. DOI:10.1111/tmi.12015.

SUNDAR, S. *et al.* **Oral treatment of visceral leishmaniasis with miltefosine.** Annals of Tropical Medicine and Parasitology, v. 93, p. 589-597, 1999. DOI:10.1080/00034989958096.

SUNDAR, S. *et al.* **Trial of oral miltefosine for visceral leishmaniasis.** Lancet, v. 352, p. 1821-1823, 1998. DOI:10.1016/S0140-6736(98)04367-0.

TADESSE, A. *et al.* **The in vitro activity of *Vernonia amygdalina* on *Leishmania aethiopica*.** Ethiopian Medical Journal, v. 31, p. 183-189, 1993.

TALAMAS-ROHANA, P. *et al.* **Lipophosphoglycan from *Leishmania mexicana* promastigotes binds to members of the CR3, p150, 95 and LFA-1 family of leukocyte integrins.** Journal of Immunology, v. 144, p. 4817-4824, 1990.

TEIXEIRA-NETO, R. G. *et al.* **Canine visceral leishmaniasis in an urban setting of Southeastern Brazil: an ecological study involving spatial analysis.** Parasite and Vectors, v. 7, p. 485-494, 2014. DOI:10.1186/s13071-014-0485-7.

THOMAS, E. *et al.* **Extract of *Vernonia condensata*, inhibits tumor progression and improves survival of tumor-allograft bearing mouse.** Scientific Reports, v. 6, 2016. DOI:10.1038/srep23255.

TONA, L. *et al.* **In vitro antiplasmodial activity of extracts and fractions from seven medicinal plants used in the democratic Republic of Congo.** Journal of Ethnopharmacology, v. 93, p. 27-32, 2004. DOI:10.1016/j.jep.2004.02.022.

UEDA-NAKAMURA, T. *et al.* **Antileishmanial activity of eugenol-rich essential oil from *Ocimum gratissimum*.** Parasitology International, v. 55, p. 99-105, 2006. DOI:10.1016/j.parint.2005.10.006.

UENO, N. *et al.* **Differences in human macrophage receptor usage, lysosomal fusion kinetics and survival between logarithmic and metacyclic *Leishmania infantum chagasi* promastigotes.** Cellular Microbiology, v. 11, p. 1827-1841, 2009. DOI:10.1111/j.1462-5822.2009.01374.x.

UNUOFIN, J. O. *et al.* **Polyphenolic content, antioxidant and antimicrobial activities of *Vernonia mespilifolia* Less. used in folk medicine in the Eastern Cape Province, South Africa.** *Journal of Evidence-Based Integrative Medicine*, v. 23, 2018. DOI:10.1177/2515690X18773990.

VAN DER WERF, M. J. **Purification and characterization of a Baeyer-Villiger monooxygenase from *Rhodococcus erythropolis* DCL14 involved in three different monocyclic monoterpene degradation pathways.** *The Biochemical Journal*, v. 347, p. 693-701, 2000. DOI:10.1042/0264-6021:3470693.

VAN ZANDBERGEN, G. *et al.* **Cutting edge: neutrophil granulocyte serves as a vector for *Leishmania* entry into macrophages.** *Journal of Immunology*, v. 173, p. 6521-6525, 2004. DOI:10.4049/jimmunol.173.11.6521.

VARGAS-INCHAUSTEGUI, D. A. **Distinct roles for MyD88 and toll-like receptor 2 during *Leishmania braziliensis* infection in mice.** *Infection and Immunity*, v. 77, p. 2948-2956, 2009. DOI:10.1128/IAI.00154-09.

VASINCU, A. *et al.* ***Vernonia kotschyana* roots: therapeutic potential via antioxidant activity.** *Molecules*, v. 19, p. 19114-19136, 2014. DOI:10.3390/molecules191119114.

VERMA, N. K.; DEY, C. S. **Possible mechanism of Miltefosine-mediated death of *Leishmania donovani*.** *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, v. 48, p. 3010-3015, 2004. DOI:10.1128/AAC.48.8.3010-3015.2004.

VICTORIA, F. N. *et al.* **Essential oil of the leaves of *Eugenia uniflora* L.: antioxidant and antimicrobial properties.** *Food and Chemical Toxicology*, v. 50, p. 2668-2674, 2012. DOI:10.1016/j.fct.2012.05.002.

VINET, A. F. *et al.* **The *Leishmania donovani* lipophosphoglycan excludes the vesicular proton-ATPase from phagosomes by impairing the recruitment of synaptotagmin V.** *PLoS Pathogens*, v. 5, 2009. DOI:10.1371/journal.ppat.1000628.

VIVARINI, A. C. *et al.* **Human cutaneous leishmaniasis: interferon-dependent expression of double-stranded RNA dependent protein kinase (PKR) via TLR2.** *FASEB Journal*, v. 25, p. 4162-4173, 2011. DOI:10.1096/fj.11-185165.

VOGT, T. **Phenylpropanoid biosynthesis.** *Molecular Plant*, v. 3, p. 2-20, 2010. DOI:10.1093/mp/ssp106.

VRANOVÁ, E. *et al.* **Network analysis of the MVA and MEP pathways for isoprenoid synthesis.** *Annual Review of Plant Biology*, v. 64, p. 665-700, 2013. DOI:10.1146/annurev-arplant-050312-120116.

WANG, W. T. *et al.* **Simultaneous study of antioxidant activity, DNA protection and anti-inflammatory effect of *Vernonia amygdalina* leaves extracts.** *PLoS One*, v. 15, 2020. DOI:10.1371/journal.pone.0235717.

WASEEM, R.; LOW, K. H. **Advanced analytical techniques for the extraction and characterization of plant-derived essential oils by gas chromatography with mass spectrometry.** Journal of Separation Science, v. 38, p. 483-501, 2015. DOI:10.1002/jssc.201400724.

WERNECK, G. L. **Visceral leishmaniasis in Brazil: rationale and concerns related to reservoir control.** Revista de Saúde Pública, v. 48, p. 851-855, 2014. DOI: 10.1590/S0034-8910.2014048005615.

WHERRY, E. J. *et al.* **Lineage relationship and protective immunity of memory CD8 T cell subsets.** Nature Immunology, v. 4, p. 225-234, 2003. DOI:10.1038/ni889.

WHITAKER, S. M. *et al.* ***Leishmania pifanoi* proteoglycolipid complex P8 induces macrophage cytokine production through toll-like receptor 4.** Infection and Immunity, v. 76, p. 2149-2156, 2008. DOI:10.1128/IAI.01528-07.

WHO. World Health Organization. **Leishmaniasis. Key facts.** 2019. Disponível em: <https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>. Acesso em: 17 ago. 2019.

WHO. World Health Organization. **WHO Traditional Medicine Strategy (2014-2023).** 2013. Disponível em: <https://apps.who.int/medicinedocs/documents/s21201en/s21201en.pdf>. Acesso em: 29 ago. 2019.

WILSON, J. *et al.* **Control of parasitophorous vacuole expansion by LYST/Beige restricts the intracellular growth of *Leishmania amazonensis*.** PLoS Pathogens, v. 4, 2008. DOI:10.1371/journal.ppat.1000179.

WIŃSKA, K. *et al.* **Essential oils as antimicrobial agents - Myth or real alternative?** Molecules, v. 24, 2130, 2019. DOI:10.3390/molecules24112130.

WOERLY, V. *et al.* **Clinical efficacy and tolerance of miltefosine in the treatment of canine leishmaniosis.** Parasitology Research, v. 105, p. 463-469, 2009. DOI:10.1007/s00436-009-1404-2.

WU, P.S. *et al.* ***Vernonia patula* (Dryand.) Merr. and *Leucas chinensis* (Retz.) R. Brown exert anti-inflammatory activities and relieve oxidative stress via Nrf2 activation.** Journal of Ethnopharmacology, v. 262, 2020. DOI:10.1016/j.jep.2020.113155.

WU, X. *et al.* ***Vernonia amygdalina* Delile extract inhibits the hepatic gluconeogenesis through the activation of adenosine-5' monophosph kinase.** Biomedicine & Pharmacotherapy, v. 103, p. 1384-1391, 2018. DOI:10.1016/j.biopha.2018.04.135.

WU, L.; VAN KAER, L. **Natural killer T cells and autoimmune disease.** Current Molecular Medicine, v. 9, p. 4-14, 2009. DOI:10.2174/156652409787314534.

YEDJOU, C. G. *et al.* **Novel cellular staining protocol and antiproliferative effect of *Vernonia amygdalina* Delile on lung and prostate cancer cells.** International Journal of

Engineering Sciences and Research Technology, v. 7, p. 552–556, 2018a.
DOI:10.5281/zenodo.1403369.

YEDJOU, C. G. *et al.* ***Vernonia amygdalina* Delile exhibits a potential for the treatment of acute promyelocytic leukemia.** Global Journal of Advanced Engineering Technologies and Sciences, v. 5, p. 1-9, 2018b. DOI:10.5281/zenodo.1343591.

YUSOFF, S. F. *et al.* **Antifungal activity and phytochemical screening of *Vernonia amygdalina* extract against *Botrytis cinerea* causing gray mold disease on tomato fruits.** Biology (Basel), v. 9, 2020. DOI:10.3390/biology9090286.

ZEMICHEAL, G.; MEKONNEN, Y. **Antiplasmodial activity of *Vernonia adoensis* aqueous, methanol and chloroform leaf extracts against chloroquine sensitive strain of *Plasmodium berghei* in vivo in mice.** BMC Research Notes, v. 11, 2018.
DOI:10.1186/s13104-018-3835-2.

ZUBEN, A. P.; DONALISIO, M. R. **Difficulties in implementing the guidelines of the Brazilian Visceral Leishmaniasis Control Program in large cities.** Cadernos de Saúde Pública, v. 2, 2016. DOI:10.1590/0102-311X00087415.